ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. I No 4

1952

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
24 FEB 1953

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA są kwartalnym organem Sekcji Mikrobiologii Ogólnej, Rolniczej i Przemysłowej P. T. M.

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie publikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm, należy przysyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, ul. Stalingradzka 85.

Aż do odwołania obowiązuje w zasadzie stosowanie się do pisowni wg Jodłowskiego i Taszyckiego, wyd. 2, r. 1951.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł (w języku publikacji oraz streszczenia), nazwisko i inicjały autora(-ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenia obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie; wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisywać krótko; tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze i istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w 2-krotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołów-

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. I No 4

1952
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Jadwiga Ziemięcka, członek koresp. P.A.N. (redaktor) — Lublin,
Władysław Kunicki-Goldfinger (sekretarz naukowy) — Lublin,
Kazimierz Bassalik, członek tytularny P. A. N. — Warszawa,
Jadwiga Jakubowska — Łódź, —:— Adolf Joszt — Gliwice,
Eugeniusz Pijanowski, członek koresp. P. A. N. — Warszawa

SEKRETARZ TECHNICZNY
Kazimierz Dygdała — Lublin

*

Adres redakcji: Lublin, ul. Stalingradzka 85

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1952

Nakład 1 000	*Zamówienie 2519*
Arkuszy wyd. 7 Druk. 6	*Druk ukończono 24.XII.52*
Papier druk. sat. V, 70 g, 70×100	*A—3—22553*

DRUKARNIA PRASOWA — LUBLIN, BUCZKA 12

Acta Microbiologica Polonica, Vol. 1, No 4

J. Opieńska-Blauth i H. Iwanowski

WPŁYW SELENU NA WZROST I PRZEMIANĘ WĘGLOWODANOWĄ W PŁYNNYCH HODOWLACH *E. COLI*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Lublinie

Wpłynęło dn. 4.IX.1952 r.

WSTĘP

Toksycznością związków selenu w hodowlach *E. coli* zajmowali się Fels i Cheldolin (1949, 1950). W związku z doświadczeniami Kluga, Moxona i Petersena (1950), przeprowadzanymi nad działaniem związków selenu na wyizolowaną z wątroby dehydrogenazę kwasu bursztynowego, wyprowadzono przypuszczenie, że mechanizm działania polega na wiązaniu selenu z grupami tiolowymi enzymów. Za tym mechanizmem przemawiają doświadczenia Bersina i Liegemanna (1951), którzy otrzymali merkaptydy selenowe oraz przeprowadzili utlenianie grup SH przy pomocy seleninów.

Dalsze potwierdzenie tych przypuszczeń stanowią doświadczenia Barrona (1951), który przy pomocy glutationu reaktywował czynność oksydazy kwasu bursztynowego zablokowanej związkami selenu. W drożdżach reaktywowano wzrost przy pomocy metioniny, siarczanów, tiaminy i cysteiny (Fels i Cheldolin 1948, 1949 i 1951), natomiast w hodowlach *E. coli* otrzymywano najlepsze wyniki przy działaniu cysteiną, a słabsze przy działaniu glutationem. Natomiast spostrzeżenia Dubois, Moxona i Olsona (1948) nad antagonistycznym stosunkiem arsenu do selenu nie znajdują dotychczas wyjaśnienia teoretycznego (Braunsztein 1949).

Tematem obecnej pracy są badania nad wpływem różnych stężeń selenu na wzrost i przemianę węglowodanową w płynnych hodowlach *Escherichia coli* i próby reaktywacji zablokowanych układów enzymatycznych.

METODA BADAŃ

Doświadczenia nasze były przeprowadzane na płynnych hodowlach *E. coli* na podłożu K o s e r a, otrzymywanych na drodze przesiewania z 24 godzinnej hodowli z agaru skośnego szczepu muzealnego. Próby poddawane były inkubacji w 37° w okresie 72-godzinnym. W próbach odpowiadających inkubacji 0, 6, 12, 24, 48 i 72 godzinnej oznaczano: wzrost bakteryjny, spadek pH, szybkość znikania glukozy.

1. Otrzymywanie dwutlenku selenu

Dwutlenek selenu otrzymano przez utlenienie selenu pierwiastkowego stężonym kwasem azotowym. Tlenki azotu usunięto przez ogrzewanie. Na drodze sublimacji w 316° otrzymano białe kryształy SeO_2 o punkcie topnienia 340°. Z dwutlenku selenu otrzymuje się selenin sodowy przez rozpuszczenie go w 4 n NaOH. Po doprowadzeniu pH roztworu do 7,5 przygotowuje się macierzysty roztwór seleninu 0,1 M.

2. Drobnoustrój

Do badań stosowano zawsze ten sam szczep *Escherichia coli* z Zakładu Mikrobiologii A. M. w Lublinie. Z 24-godzinnej hodowli na agarze skośnym przygotowywano gęstą zawiesinę bakteryjną w fizjologicznym roztworze soli. Przy sporządzaniu zawiesiny przenoszono zawsze tę samą ilość oczek platynowych z agaru skośnego do określonej objętości roztworu soli fizjologicznej. Zawiesinę po wymieszaniu, bezpośrednio przed użyciem, rozlewano w ilości po 0,5 ml do jałowych erlenmeyerek (50 ml), zawierających po 10 ml pożywki Kosera.

3. Podłoże

Jako podłoże stosowano syntetyczną pożywkę Kosera o następującym składzie: glukoza 2 g, fosforan amonowy I rz. 10 g, fosforan potasowy II rz. 1 g, siarczan magnezowy ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,2 g, chlorek sodowy 5,0 g, woda destylowana 1000 ml.

4. Inkubacja hodowli w pożywce Kosera

Inkubację przeprowadzono w 50-mililitrowych erlenmeyerkach w 37° przez 0, 3, 6 12, 24, 48 i 72 godziny.

Hodowle zabijano przez 15-minutowe ogrzewanie na wrzącej łaźni wodnej.

5. Oznaczenie wzrostu bakterii

Wzrost bakterii oznaczano metodą nefelometryczną, porównawczo z wzorami przygotowanymi według skali Mc Farlanda.

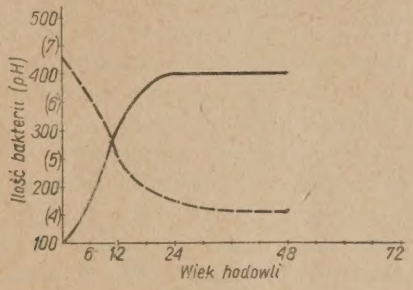
6. Oznaczanie pH

Oznaczenie pH przeprowadzano przy pomocy autojonometru firmy „Radiometer".

7. Zanikanie glukozy w podłożu

Zanikanie glukozy w podłożu śledzono metodą chromatografii bibułowej. Jako układ rozpuszczalników stosowano: butanol, pirydynę, wodę, w stosunku 45:25:40 (O p i e ń s k a - B l a u t h i M a d e c k a - B o r k o w s k a, 1951). Posługiwano się

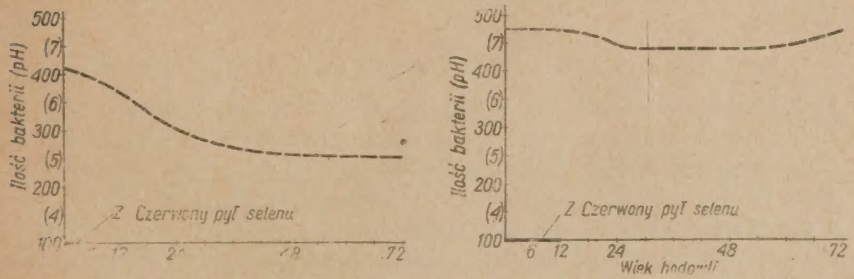
bibułą Whatmana Nr 1. Jako test wywoławczy dla glukozy lub innych metabolitów o charakterze redukującym stosowano zmodyfikowany test z azotanem srebra (Trewelyan, Proctor i Harrison, 1950).



Rys. 1. — Wzrost ilości bakterii i zakwaszenia w hodowli *E. coli* na podłożu Kosera.
Objaśnienia ———— : Ilość bakterii (w stosunku do początkowej ilości przyjętej za 100).
.... : pH podłoża.

Рис. 1. Увеличение количества бактерий и повышение кислотности среды в культурах *E. coli*. Среда Козера.
Обьяснения; ———— —количество бактерий (в отношении к начальному количеству принятому за 100)
..... —pH среды.

Fig. 1. — The bacteria-count and the pH changes during the growth of *E. coli* in Koser medium.
———— : the number of bacteria (the initial number = 100).
.... : pH of the medium.



Rys. 2 i 3. — Wpływ selenu na wzrost ilości bakterii i zakwaszenia podłoża w hodowli *E. coli*.
Objaśnienia jak do rys. 1. Rys. 2—1. 10^{-3} M Se, rys. 3—5. 10^{-3} M Se.

Рис. 2 и 3. Влияние селена на рост бактерий и кислотность среды в культурах *E. coli*.
Обьяснения: см. рис. 1.
Рис. 2–1. 10^{-3} M Se, рис. 3–5. 10^{-3} M Se

Fig. 2. and 3. — The effect of the selene on the growth and on the changes in pH of the medium in the culture of *E. coli*.
Denotation as in Fig. 1. Fig. 2. — 1. 10^{-3} M Se. Fig. 3 — 5. 10^{-3} M Se.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

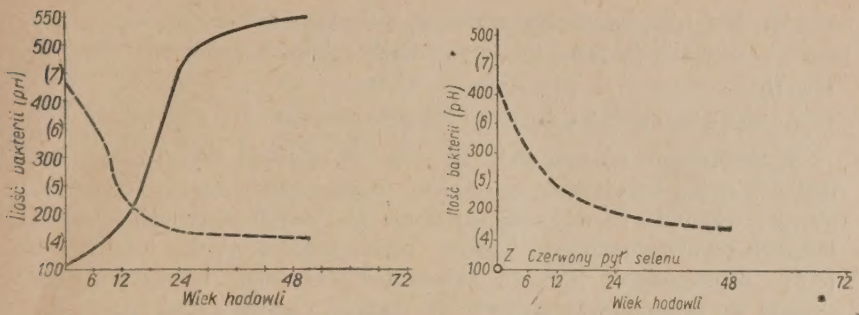
W poniższych doświadczeniach stosowaliśmy różne stężenia selenu (pod postacią seleninu) w granicach od $1 \cdot 10^{-9}$ M Se do $5 \cdot 10^{-3}$ M Se W stężeniu od $1 \cdot 10^{-9}$ M Se do $1 \cdot 10^{-5}$ M Se nie zauważono żadnego wpływu, zarówno aktywującego, jak i hamującego wzrost lub przemianę węglowodanową *E. coli* (Tabl. I). Dopiero w stężeniu $1 \cdot 10^{-4}$ M Se zaznacza się zwolnienie znikania glukozy. Zmiany w pH są takie jak i przy niższych stężeniach selenu. Wzrostu bakteryjnego w tym wypadku nie oznaczano, ponieważ już przy tych stężeniach seleninu wypada w podłożu czerwony pył pierwiastkowego selenu. Przy wyższych stężeniach selenu ($1 \cdot 10^{-3}$ M Se) zaznacza się wyraźnie zwolnienie przemiany węglowodanowej. Podczas gdy w normalnej hodowli glukoza znika całkowicie w czasie 24 godzin, to w obecności selenu w stężeniu $1 \cdot 10^{-3}$ M Se glukoza występuje jeszcze wyraźnie nawet po 72 godzinach inkubacji. spadek pH jest nieznaczny (rys. 1, 2, 3). Na chromatogramach występuje oprócz glukozy jeszcze związek o własnościach redukujących, którego R_F różni się znacznie od R_F glukozy. Związek ten występuje na chromatogramach pod postacią bardzo słabej plamy dopiero po 24-godzinnej hodowli (Tabl. I). Przy wyższych stężeniach selenu ($5 \cdot 10^{-3}$ M Se) związek ten występuje pod postacią bardzo słabej plamy na chromatogramie dopiero po 72 godzinach. Zarówno spadek pH, jak i znikanie glukozy są wówczas znikome. (Wzrostu bakteryjnego w tym wypadku nie oznaczano z powodu wypadania w hodowli osadu selenu pierwiastkowego).

1. Próby reaktywacji chlorowodorkiem cysteiny

Do reaktywacji blokady selenowej ($1 \cdot 10^{-3}$ M Se) zastosowaliśmy stężenie chlorowodorku cysteiny pięciokrotnie wyższe od stężenia selenu. Chlorowodorek cysteiny zobojętniony do pH 7,2 dodawano do hodowli bądź na początku inkubacji (czas=0), bądź po 30 minutach lub też po 6 godzinach inkubacji. We wszystkich trzech wypadkach nie wystąpił charakterystyczny obraz zatrucia selenowego, co wyraża się normalnym spadkiem pH i normalnym znikaniem glukozy (Tabl. II, rys. 4 i 5).

2. Próby reaktywacji chlorowodorkiem histydyny

Stwierdziliśmy przede wszystkim, że dodatek chlorowodorku histydyny ($2 \cdot 10^{-2}$ M) do podłoża nie zawierającego selenu wpływał dodatnio na wzrost bakteryjny i szybkość znikania glukozy (Tabl. II, rys. 6). Dodatek histydyny w stężeniu $2 \cdot 10^{-2}$ M do hodowli *E. coli* zawierającej selen w stężeniu $1 \cdot 10^{-3}$ M Se reaktywował zahamowane procesy zarówno



Rys. 4. — Wpływ cysteiny ($5 \cdot 10^{-3}$ M) na wzrost ilości bakterii i zakwaszenia podłoża w hodowli *E. coli*

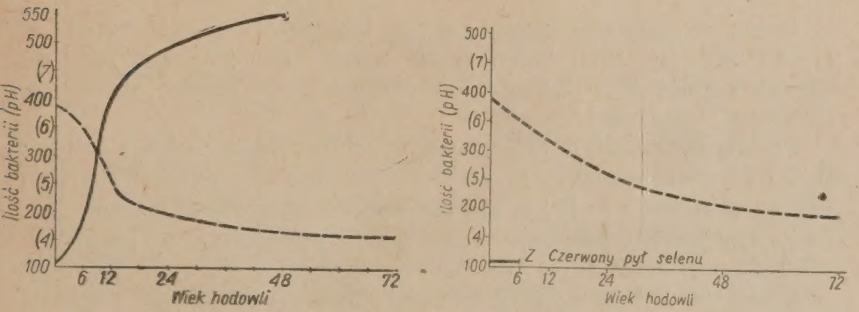
Rys. 5. — Wpływ cysteiny ($5 \cdot 10^{-3}$ M) przy zatruciu selenem ($1 \cdot 10^{-3}$ M) *E. coli*. Objaśnienia jak w rys. 1.

Рис. 4. Влияние цистеина ($5 \cdot 10^{-3}$M) на рост бактерий и кислотность среды в культурах *E. coli*.
Обьяснения: см. рис. 1.

Рис, 5. Влияние цистеина ($5 \cdot 10^{-3}$M) при отравлении *E. coli* селеном ($1 \cdot 10^{-3}$M Se)
Обьяснения: см. рис. 1.

Fig. 4. — The effect of cysteine ($5 \cdot 10^{-3}$ M) on the growth and on changes of pH of the medium in the culture of *E. coli*. Denotation as in Fig. 1.

Fig. 5. — The effect of cysteine ($5 \cdot 10^{-3}$M) on the growth and changes of pH in the case of selene intoxication in *E. coli*. Denotation as in Fig. 1.



Rys. 6. — Wpływ histydyny ($2 \cdot 10^{-2}$ M) na wzrost ilości bakterii i zakwaszenie podłoża w hodowli *E. coli*.

Rys. 7. — Wpływ histydyny ($2 \cdot 10^{-2}$ M) przy zatruciu selenem ($1 \cdot 10^{-3}$ M) *E. coli*.

Рис. 6. Влияние гистидина (2×10^{-2}M) на рост бактерий и кислотность среды в культурах *E. coli*.
Обьяснения: см. рис. 1.

Рис. 7. Влияние гистидина (2×10^{-2}M) при отравлении *E. coli* селеном ($1 \cdot 10^{-3}$ M).
Обьяснения: см. рис. 1.

Fig. 6. — The effect of histidine ($2 \cdot 10^{-2}$ M) on the growth and on changes of pH of the medium in the culture of *E. coli*. Denotation as in Fig. 1.

Fig. 7. — The effect of histidine ($2 \cdot 10^{-2}$ M) on the growth and changes of pH of the medium in the case of selene intoxication in *E. coli*. Denotation as in Fig. 1.

wtedy, gdy histydyna była wprowadzona do podłoża selenowego na początku inkubacji, jak i po 30 minutach lub po 6 godzinach (Tabl. II, rys. 7).

3. Próby reaktywacji siarczanem magnezowym

W nawiązaniu do prac Abelsona i Aldousa (1950) przeprowadziliśmy próby reaktywacji siarczanem magnezowym. Wyżej wymienieni autorzy wykazali, że toksyczne działanie niektórych pierwiastków metalicznych dwuwartościowych jak np. niklu, kobaltu, cynku i innych na pewne drobnoustroje (*E. coli, Aerobacter aerogenes, Aspergillus niger*) dawało się zobojętnić po dodaniu do podłoża dużych stężeń jonów magnezu.

Do reaktywacji blokady selenowej stosowaliśmy siarczan magnezowy w stężeniu 1 M. Siarczan magnezowy dodany w tym stężeniu do podłoża bezselenowego częściowo hamował przemianę węglowodanową i osłabiał wzrost bakteryjny. Po dodaniu siarczanu magnezowego do podłoża selenowego nie stwierdziliśmy reaktywacji. Podkreślić należy, że w obecności zwiększonych ilości siarczanu magnezowego nie nastąpiła redukcja seleninów do selenu i nie wystąpił na chromatogramach metabolit obecny zawsze w przypadkach zatruć selenem (Tabl. III).

4. Próby reaktywacji jonami SO_4

Nasze doświadczenia opierały się na badaniach Felsa i Cheldolina (1948, 1950, 1951), którzy reaktywowali zarówno wyciągi jak i zawiesiny drożdżowe w podłożach selenowych przy pomocy metioniny i siarczanu sodowego.

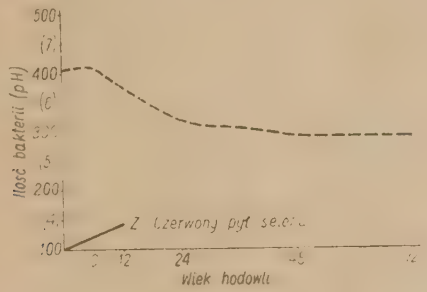
Przeprowadziliśmy doświadczenia w celu zbadania wpływu różnych stężeń siarczanu sodowego na *E. coli* w pożywkach z selenem. Siarczan sodowy w stężeniu $7 \cdot 10^{-4}$ M nie ma wpływu na szybkość znikania glukozy, spadek pH i powstawanie metabolitu pośredniego w hodowlach zawierających selen ($1 \cdot 10^{-3}$ M Se). Pod wpływem siarczanu sodowego w stężeniu $1 \cdot 10^{-2}$ M szybkość znikania glukozy i spadek pH pozostały bez zmian, a metabolit pośredni w tych warunkach nie występował. (Tabl. III).

5. Próby reaktywacji arseninami

Próbowaliśmy również opierając się na doświadczeniach Dubois, Moxona, Olsona (1948) przeprowadzić próby reaktywacji zatruć selenem arseninami.

Stwierdziliśmy, że arseniny w stężeniu $1 \cdot 10^{-5}$ M As nie mają wpływu na wzrost bakteryjny i przemianę węglowodanową *E. coli*. W podłożach zawierających selen ($1 \cdot 10^{-3}$ M Se) arseniny, dodane w stężeniu $1 \cdot 10^{-5}$ M,

nie wpływały na metabolizm węglowodanowy. Natomiast przy stężeniu $5 \cdot 10$ M As, nie oddziaływującym na *E. coli*, w obecności selenu ($1\ 10^{-3}$ M Se) wystąpiło całkowite zahamowanie przemiany węglowodanowej. Wzrostu bakteryjnego nie oznaczano z powodu wypadania czerwonego pyłu selenu (Tabl. IV, rys. 8).



Rys. 8. — Wpływ arseninów (10^{-3} M) przy zatruciu selenem ($1 \cdot 10^{-3}$ M) *E. coli*. Objaśnienia: patrz rys. 1.

Рис. 8. Влияние арсенитов ($1 \cdot 10^{-3}$M As) при отравлении *E. coli* селеном. Обьяснения: см. рис. 1.

Fig. 8. — The effect of arsenite (10^{-3} M As) on the growth and on changes of pH of the medium in the case of selene intoxication in *E. coli*. Denotation as in Fig. 0.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Własności toksyczne związków selenu w odniesieniu do świata zwierzęcego opisywane były w latach 1933—34 pod nazwą „choroby alkalicznej" bydła i koni, żywionych paszą z terenów selenonośnych w Meksyku, Dakocie i Kanadzie (Monier — Williams, 1949). W świecie roślinnym, w szczególności u zbóż, stwierdzano pobudzanie wzrostu przy nieznacznych stężeniach selenu znajdującego się w glebie (Bobko i Schenurenkowa, 1945). Podobnie i u niektórych pleśni stwierdzano pobudzenie wzrostu pod wpływem nieznacznych stężeń selenu (Porter 1947). Wpływem selenu na wzrost w hodowlach *E. coli* zajmowali się Fels i Cheldolin (1949).

W naszych doświadczeniach seleniny w różnych stężeniach, w granicach od $1\ 10^{-9}$ M Se do $1\ 10^{-5}$ M Se, nie wpływały pobudzająco na wzrost i szybkość znikania glukozy. W stężeniach powyżej $1\ 10^{-4}$ M Se stwierdzono wyraźne zahamowanie wzrostu bakteryjnego i przemiany węglowodanowej. W hodowlach *E. coli* na podłożach zawierających selen w stężeniach powyżej $1\ 10^{-4}$ M Se stwierdziliśmy wyraźnie, w miarę postępującej inkubacji, stopniową przemianę seleninu do selenu pierwiastkowego (wypadanie czerwonego pyłu w podłożu). Podobne

obserwacje poczynił Hewitt (1951) w doświadczeniach na tkankach zwierzęcych i kulturach *Cor. diphteriae*.

Na podstawie naszych doświadczeń nie mogliśmy ocenić, czy toksycznie działają seleniny, czy też selen pierwiastkowy bądź jego pochodne. Według Lundegardha (1947) najsilniej działają seleniny, słabiej seleniany i selenki. Seleniany ulegają jednak łatwo redukcji do seleninów, a seleniny do selenu. Wpływ związków selenu na przemianę węglowodanową był badany dotychczas fragmentarycznie. Wyniki dotychczasowych badań nie pozwalają jeszcze wyjaśnić mechanizmu toksycznego działania selenu.

Wyniki naszych doświadczeń przemawiają za słusznością przypuszczeń Bersina i Liegemanna (1951) odnośnie sprzęgania selenu z grupami tiolowymi enzymów. Hipotezę tę potwierdza wg nas fakt występowania w podłożu selenowym metabolitu pośredniego, wykazującego własności redukujące, a nie będącego glukozą. Współczynniki R_F tego związku i glukozy różnią się wyraźnie.

Podobnie przy zatruciu hodowli jodooctanem otrzymywaliśmy na chromatogramach podłoża plamy nieznanego związku o własnościach redukujących, o tym samym R_F i tych samych cechach zewnętrznych, jakie obserwowano w obecności selenu (Opieńska-Blauth, Borkowski, Madecka-Borkowska, 1951). Podobnie w doświadczeniach nad działaniem związków kobaltu na *E. coli* i *Proteus vulgaris* stwierdzano również występowanie nieznanego metabolitu w podłożu (Madecka-Borkowska, 1952). Prace doświadczalne nad identyfikacją tego związku są obecnie przeprowadzane (Opieńska-Blauth, Borkowski, Madecka-Borkowska, 1952).

Dowodów na słuszność przypuszczenia co do wiązania selenu z grupami tiolowymi enzymów dostarczają również nasze próby reaktywacji czynności zablokowanych enzymów przy pomocy cysteiny. Reaktywację osiągnęliśmy chlorowodorkiem cysteiny po 6 godzinach inkubacji w podłożu selenowym. Wyniki nasze pokrywają się z wynikami Felsa i Cheldolina (1949), osiągniętymi w doświadczeniach na hodowlach bakteryjnych.

Równolegle z próbami reaktywacji cysteiną prowadziliśmy doświadczenia z chlorowodorkiem histydyny. Chlorowodorek histydyny, dodany do podłoża selenowego z zawiesiną bakteryjną po 6-godzinnej inkubacji, reaktywował przemianę glukozy. Wyniki tych doświadczeń zgodne są z spostrzeżeniami Burka, Haerona i Schadego (1946), którzy próbowali usuwać zatrucia kobaltem przy pomocy histydyny. Autorzy ci podkreślają duże znaczenie wiązań imidazolowych, podobnie jak grup

tiolowych, dla czynności enzymów. Według nich blokowanie wiązań imidazolowych odgrywa podobną rolę przy hamowaniu czynności niektórych enzymów co i blokowanie grup tiolowych.

W doświadczeniach naszych zwróciliśmy uwagę na znaczny wzrost i o wiele szybsze znikanie glukozy w obecności histydyny, w porównaniu z warunkami normalnymi. Na podstawie doświadczeń Felsa i Chelidelina możnaby to tłumaczyć odrębnością mechanizmów syntezy metioniny u drożdży i u *E. coli*.

Próby potwierdzenia spostrzeżeń Dubois, Moxona i Olsona (1948) w tkankach zwierzęcych nad antagonizmem między selenem i arsenem nie dały pozytywnych wyników. Nasze doświadczenia w hodowlach *E. coli*, do których dodawaliśmy oprócz seleninu arsenin, wykazały raczej nie antagonizm ale sumowanie działania toksycznego obu inhibitorów.

O ile przyjąć pewną analogię między działaniem toksycznym selenu a działaniem niektórych metali dwuwartościowych jak kobalt, nikiel, cynk i inne, możnaby przypuszczać, że jony magnezu dodane w większych stężeniach będą reaktywowały zatrucia selenem. Istnieje bowiem przypuszczenie, że zachodzi współzawodnictwo między jonami magnezu, a jonami niektórych metali dwuwartościowych. Nasze doświadczenia nie potwierdziły tych przypuszczeń. Również nie stwierdziliśmy analogii w działaniu jonów SO_4 na reaktywację zatruć selenem w hodowlach *E. coli* i drożdżach (zawiesinach i wyciągach).

Я. Опенска-Бляут и Г. Ивановски

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА НА РОСТ И МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ В ЖИДКИХ КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI*

Резюме

Опыты проводились в жидких культурах *Escherichia coli* на синтетической среде Кэзера с разными концентрациями селена, прибавляемого в виде селенитов. Рост бактерий обозначался по нефелометрическому методу, пользуясь шкалой Мэк Ферлана. Углеводный метаболизм (исчезание глюкозы из среды) отмечался по методу нисходящей хроматографии распределения на бумаге. Применялась смесь растворителей: бутанол, пиридин, вода в отношении 45 : 25 : 40. Авторы пользовались фильтрационной бумагой Уотмена Нр I. Для проявления хроматограммов применялась модифицированная проба с $AgNO_3$.

Констатировано восстановление селенитов до металлического селена уже спустя несколько часовой инкубации при температуре 37°. Токсическое влияние селена на рост бактерий и метаболизм углеводов выступает уже при концентрации 1.10^{-4} M Se. При концентрации десять раз большей (1.10^{-3} M Se) наблюдается очень ясно задержание роста бактерий и заквашения среды. Кроме того процесс исчезания глюкозы в среде подвергается замедлению. На хроматограммах кроме глюкозы появляется новое восстанавливающее соединение. Коэффициент R_F этого соединения,

форма и цвет пятна в пробе с $AgNO_3$, замедленное выступание пятна в сравнении с глюкозой напоминают свойства метаболита, тоже получаемого в культурах *E. coli* на среде Козера при отравлении иодоуксуснокислой солью, а также кобальтом.

При концентрациях ниже 1.10^{-4}M Se – 1.10^{-9}M Se не установлено в наших экспериментальных условиях активизирующего действия селена на рост или метаболизм углеводов *E. coli*. Пробы реактивирования процессов, блокированных селеном, с помощью цистеина о концентрации пять раз превышающей концентрацию селена, оказались позитивными. Этот факт как-будто подтверждает предположение Баррона (1951), по мнению которого селенистая кислота является обратимым ингибитором тиоловых групп, образующих меркаптиды.

Активирование энзиматических процессов, блокированных селеном, при помощи гистидина подтверждаются наблюдениями Бюрка и других (1946). Эти авторы на основании исследования действия кобальта на целый ряд микроорганизмов и реактивирующего действия гистидина пришли к заключению, что для деятельности некоторых энзимов имеют большое значение имидазоловые группы. Пробы же реактивирования процессов, блокированных селеном, с помощью сернокислых солей при концентрациях от 7.10^{-4}M до 1.10^{-2}M Na_2SO_4 не дали положительных результатов. Это подтверждает наблюдение Фельса и Шельдолена (1948) относительно отличия механизмов синтеза метионина у дрожжей и у *E. coli*.

Пробы реактивации процессов блокированных селеном, при помощи ионов Mg дали отрицательный результат, что указывало бы на отсутствие аналогии относительно токсического действия селена и двухвалентных металлов таких как, никель, цинк, кадмий, железо, кобальт и др. На основании этих результатов можно бы предполагать, что при блокаде, вызванной селеном, играет главную роль не двувалентный селен, но кислородные соединения четырех – и шестивалентного селена. Пробы применения вместе с селеном при концентрации 1.10^{-3}M Se арсенитов при концентрациях 1.10^{-5}M – 5.10^{-3}M As не обнаружили антагонизма между селеном и мышьяком, на что указывал Дюбуа (1948) в своих экспериментах над животными.

J. Opieńska-Blauth and H. Iwanowski

THE EFFECT OF SELENITE ON THE GROWTH AND GLUCOSE METABOLISM IN THE FLUID CULTURES OF *ESCHERICHIA COLI*

Summary

The effect of various concentrations of selenite on *E. coli* in Koser's medium was studied. The increase of the number of bacteria was evaluated approximately by nepheiometric method. Glucose metabolism (the decrease of the amount of glucose in medium) was determined with help of paper chromatography.

As solvent n-butanol-piridine-water (45:25:40) mixture was used. The glucose spots were developed by spraying, (modified $AgNO_3$ test).

The reduction of selenite to elementary selene was observed already after few hours incubation of *E. coli* culture at 37°.

The selene exerted a toxic influence on *E. coli* in concentrations up from 1.10^{-4}M Se. In medium containing selene in concentration 1.10^{-4}M the inhibition of growth and of glucose metabolism was quite marked. The decrease of pH of medium was negligeable. The amount of glucose, as determined by paper chromatography method, remained almost unchanged.

On the chromatogramms there were to be noted besides the spots characteristic for glucose, the spots of an unknown reducing compound. The R_F value, the shape and colour of the spots of this unknown substance was similar to these of an unknown intermediate metabolite, observed in *E. coli* cultures in the case of monoiodacetate- and cobalt-intoxications.

No effect, either stimulating or toxic, of selenite in concentrations below 1.10^{-4} M Se (to 1.10^{-6} M Se) was noted.

It was shown that the enzymatical processes blocked by the selenite could be reactivated by cysteine. (Table II, Fig. 4, 5). This observation is in agreement with Brown's (1951) suggestion, that the selenous acid exerts reversibly toxic influence on the thiol groups.

The selenite-blockade could be reverted also by the histidine (Table II, Fig. 6, 7). It would appear that the effect of histidine in this case could be similar to the influence of histidine in the cobalt-blokade of imidazol-groups of some enzymes (Burke *et al*, 1946).

The reversion of selenite-blockade with sulphate ions (Na_2SO_4 in $7\ 10^{-2}$ M concentrations) proved to be impossible (Table III). Very possibly it may indicate, in accordance with Fels and Cheldolin's (1948) observation, that the formation of methionine in *E. coli* has different course than in yeasts.

There was observed no influence of Mg ions in the selenite-blockade (Table III). It seems then, that the mechanism of toxic action of selene and of some bivalent metals (Ni, Co, Fe, Zn, Cd) is different. It is possible that the toxic effect is exerted by IV- and VI-valent selene rather than by bivalent one.

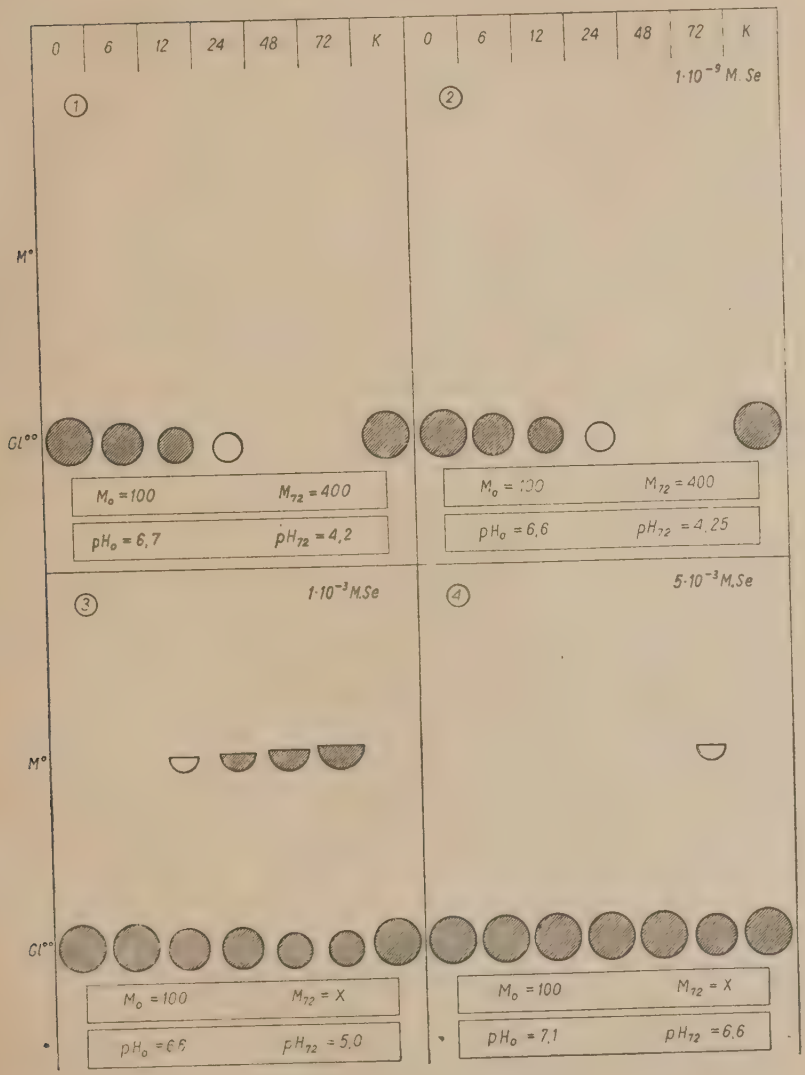
There was no antagonism between Se and As in the culture of *E. coli* (Table IV, Fig. 8), shown by Dubois (1948) to occur in animals.

LITERATURA

1. Abelson P. H. i Aldous E.: Ion antagonisms in microorganisms Interference of normal magnesium metabolism by Ni, Co, Cd, Zn. Mn. J. Bact., 1950. 60. 2. Bersin T. i Liegemann W. Z.: Physiol. Chemie., 1933, 220:209 cyt. wg Chalenger F., 1951. 3. Barron E. G., Zelma Baker, Miller G. i Kalnitzky G.: The oxidation of dithiols. Biochem. J. 1947, 41:62. 4. Braunsztein A. E.: Biochimia aminokislotnego obmiena. A. M. N. Moskwa 1949. 5. Burk D., Hacron J. i Schade A.: A reversible complex of cobalt, histidine and oxygen gas. J. Biol. Chem., 1946, 165:723. 6. Bobko E. V. i Schenurenkowa N. P.: Comp. Rend. Sci. U.R.S.S., 46, cyt. wg Lundegardh H., 1947 7. Chalenger F.: Biological Metyviation. Adv. Enzymol. 1951. 11:226. 8. Dubois K. P., Moxon A. L. i Olson O. E.: Farther studies on the effectiveness of arsenic in preventing selenium poisoning. J. Nutrition, 1948, 19:477. 9. Fels J. G. i Cheldolin V. H.: Methionine in selenium poisoning. J. Biol. Chem. 1948, 173:819. 10. Fels J. G. Cheldolin V. H.: Selenate inhibition studies. The role of sulfate in selenate toxicity in yeast. Arch. of Biochem. 1949, 22:402. 11. Fels J. G. i Cheldolin V. H.: Selenate inhibition studies. J. Biol. Chem. 1950, 185:803. 12. Fels J. G. i Cheldolin V. H.: The role of sulfate in selenate toxicity in yeast. Bull. Inst. Pasteur, 1951, 49:412. 13. Fels J. G. i Cheldolin V. H.: Selenate inhibition studies. III. The reversal of selenate inhibition in *E. coli*. Arch. of Biochem., 1949, 22:323. 14. Hewitt L. F.: Selenite effect on cell-structure of *C. diphteriae, C. fasciens, Bacillus cereus*. J. Gen. Microbiol., 1951, 5:287.

15. Klug H. L., Moxon A. L. i Petersen D. E.: The in vivo inhibition of succinic dehydrogenase by selenium and its release by arsenic. Arch. of Biochem., 1950. **28**:105. 16. Lundegardh H.: Mineral nutrition of plants. Ann. Rev. Biochem., 1947, **16**:524. 17. Madecka-Borkowska I.: Badania porównawcze nad wpływem kobaltu na wzrost, oddychanie i przemianę węglowodanową u *Proteus vulgaris* i *Aerobacter aerogenes*. 1951, (rękopis). 18. Monier G. i Williams G. W.: Trace elements in Food. Chapman Hall, London 1949. 19. Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I. i Borkowski T.: Badania porównawcze nad metabolizmem laktozy, glukozy. i galaktozy w płynnych hodowlach pałeczki okrężnicy, *Esch. coli*. Acta Physiol. Polon., 1951, **2**:123. 20. Opieńska-Blauth J. i Madecka-Borkowska I.: Rozdzielanie cukrowców o zbliżonym współczynniku R_F z mieszanin metodą chromatografii bibułowej. Acta Physiol. Polon. 1951, **4**:135. 21. Opieńska-Blauth J., Borkowski T. i Madecka-Borkowska I.: Wykrywanie związków pośrednich przemiany węglowodanowej *E. coli* na podłożu syntetycznym. 1952, (w przygotowaniu). 22. Trevelyan W. E., Proctor D. P. i Harrison J. S.: Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 1950, **166**:444.

Tabl. I.



Objaśnienia do tab. I na str. 286.
Объяснения к табл. I на стр. 286
For legend for Table I see p. 286.

Tabl. I. I. Chromatogramy glukozy (Gl) i metabolitu pośredniego (M) w hodowlach *E. coli* na podłożu Kosera bez selenu (1) i z różnymi stężeniami selenu (2—4).

Układ: butanol, pirydyna, woda w stosunku 45:25:40

Objaśnienia — M_{72} — ilość bakterii po 72^h w stosunku do początkowej ilości przyjętej za 100.
pH_0 — pH początkowe
pH_{72} — pH końcowe po 72^h

Табл. I. Хроматограммы глюкозы (Gl) и промежуточного метаболита (M°) в культурах *E. coli* на среде Козера без селена (I) и с селеном в различных его концентрациях (2—4).

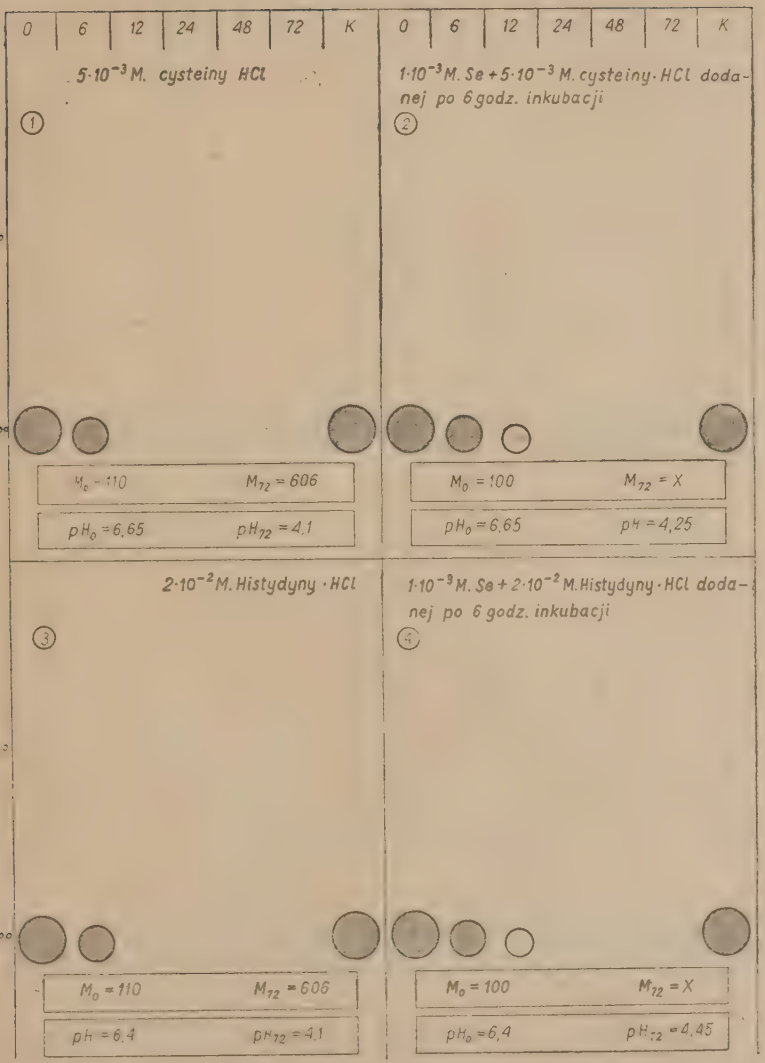
Растворитель: смесь бутанола, пиридина и воды в отношении 45 : 25 : 40.
Объяснения. M_{72}—количество бактерий спустя 72 часов в отношении к начальному количеству принятому за 100, pH_0 – начальное pH. pH_{72}–pH среды спустя 72 часов.

Table I. — Paper chromatography of glucose (Gl) and an intermediate metabolite (M˚) in the cultures of *E. coli* in the media containing no selene (No 1) and in media with various concentrations of selene (No 2, 3, 4).
in media with various concentrations of selene (no 2, 3, 4).

Solvent: n-butanol-piridine-water mixture 45:25:40.

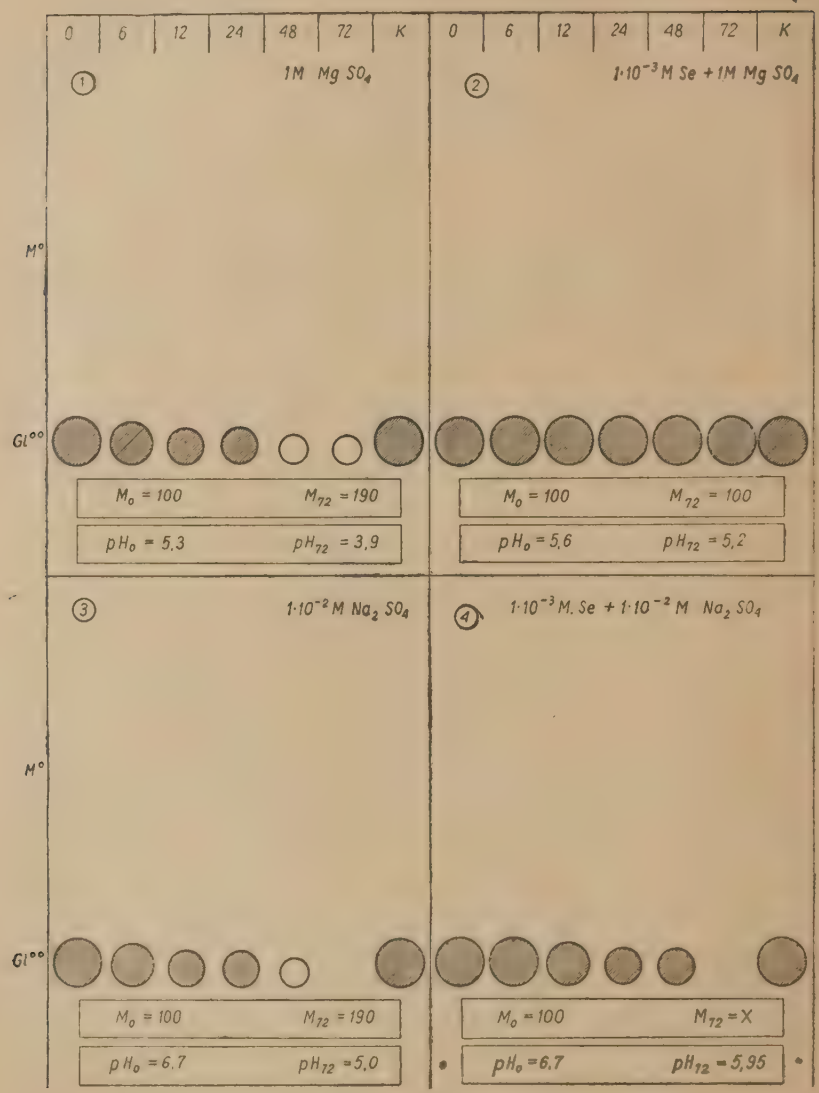
M_{72} — number of bacteria after 72 hours incubation in relation to initial number of bacteria (= 100). pH_0 — initial pH. pH_{72} — pH after 72 hours incubation.

Tabl. II.



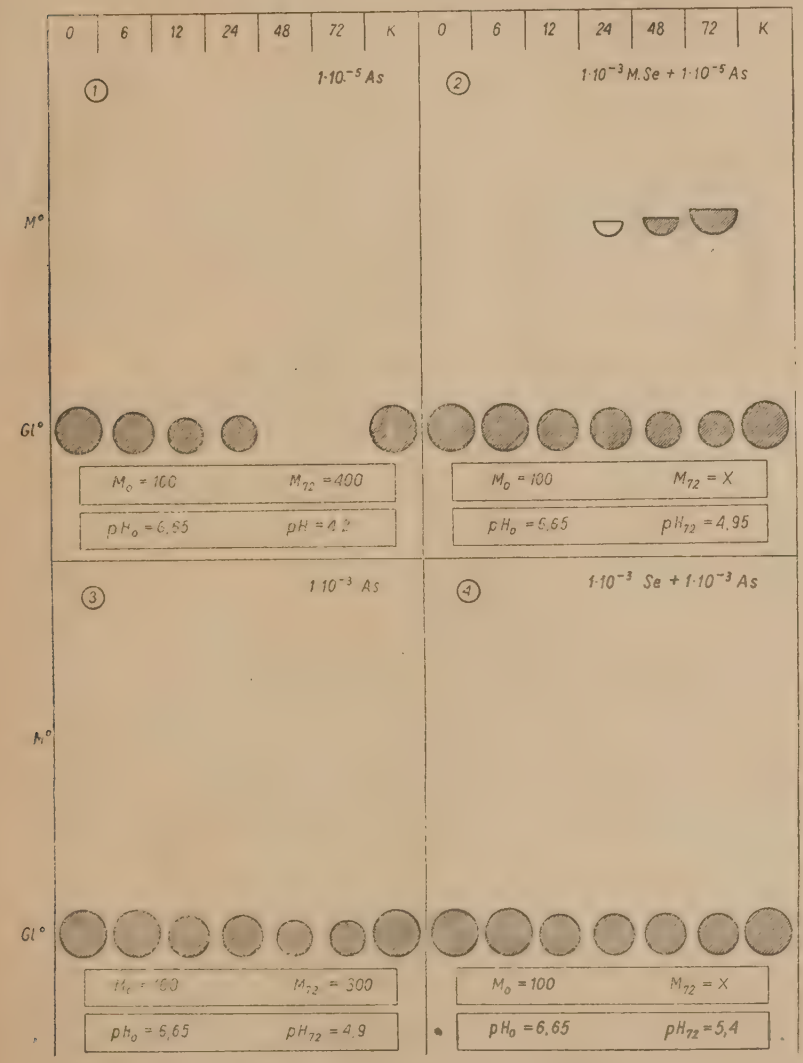
Objaśnienia do tabl. II na str. 290.
Обьяснения к табл. II на стр 290
For legend for Table II see p. 290.

Tabl. III.



Objaśnienia do tabl. III na str. 290.
Объяснения к табл. III на стр. 290
For legend for Table III see p. 290.

Tabl. IV.



Objaśnienia do tabl. IV na str. 290.
Объяснения к табл. IV на стр. 290
For legend for Tabl. IV see p. 290.

Tabl. II. Wpływ cysteiny i histydyny przy zatruciu selenem *E. coli*.
Objaśnienia jak w tablicy I.

Табл. II. Влияние цистеина и гистидина при отравлении *E. coli* селеном.
Объяснение: см. табл. I.

Table II. — The effect of cysteine and of histidine on *E. coli* in the case of selenite intoxication. Denotation as in Table I.

Tabl. III. Wpływ jonów $Mg^{\cdot\cdot}$ i SO_4'' przy zatruciu selenem *E. coli*.
Objaśnienia jak w tablicy I.

Табл. III. Влияние ионов $Mg^{\cdot\cdot}$ и SO_4'' при отравлении *E. coli* селеном.
Объяснение: см. табл. I.

Table III. The effect of Mg and SO_4 ions on *E. coli* in the case of selenite intoxication. Denotation as in Table I.

Tabl. IV. Wpływ arseninów przy zatruciu selenem *E. coli*.
Objaśnienia jak w tablicy I.

Табл. IV. Влияние арсенитов при отравлении *E. coli* селеном.
Объяснение: см. табл. I.

Table IV. The effect of arsenite on *E. coli* in the case of selenite intoxication. Denotation as in Table I.

T. Lityński, H. Jurkowska i Z. Żak

WPŁYW WĘGLA BRUNATNEGO NA PRODUKCJĘ KWASU CYTRYNOWEGO U KROPIDLAKA *(ASPERGILLUS NIGER)*

Z Zakładu Chemii Rolnej UJ w Krakowie

Wpłynęło dnia 6.IX.1952 r.

WSTĘP

Zastosowanie kropidlaka *(Aspergillus niger)* do produkcji kwasu cytrynowego ma duże znaczenie gospodarcze. Z tego też względu poświęcono wiele uwagi zagadnieniu podniesienia wydajności tego procesu. Prowadzone prace idą w kierunku otrzymania szczepów odznaczających się wytwarzaniem dużej ilości kwasu, zapobiegania degeneracji tych szczepów oraz znalezienia optymalnych warunków hodowli.

Stymulujący wpływ węgla brunatnego na rozwój kropidlaka oraz antytoksyczne działanie węgla w hodowlach tego organizmu stwierdziliśmy w jednej z poprzednich prac (Lityński i Jurkowska, 1952). Obecnie zajęliśmy się przebadaniem wpływu węgla na produkcję kwasu cytrynowego.

MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODYKA

Do doświadczeń użyliśmy czystą hodowlę kropidlaka czarnego *(Aspergillus niger)*, odznaczającego się niewielką zdolnością wytwarzania kwasu cytrynowego.

Stosowany węgiel brunatny pochodził z Konina. Węgiel ten, w stanie wysuszonym na powietrzu, zawierał 10% wody, 78,5% substancji organicznych oraz 11,5% substancji nieorganicznych (popiół). Z połączeń organicznych przeszło 20% stanowią ciała próchniczne, z czego około 7% przypada na próchnicę kwaśną, a około 14% na próchnicę słodką. Ze składników popielnych 7,9% rozpuszcza się w 1 n HCl (są to przeważnie sole wapniowe, żelazowe i magnezowe), reszta w kwasie solnym jest nierozpuszczalna i po większej części składa się z krzemionki. Użyty węgiel zawiera około 64% węgla, 0,6% azotu, 0,2% fosforu oraz 0,07% potasu. Odznacza się wysoką pojemnością wodną (175%), jego pH w wyciągu wodnym wynosi 6,8, w wyciągu n KCl — 6.0. Kwasowość ogólna wynosi 30 m. e. H 100 g, zasadowość 140 m. e. Ba-

danie zdolności sorbcyjnej węgla wykazało, że chłonie on w znacznej ilości zarówno kationy, jak i aniony.

Doświadczenie prowadzono na pożywkach A i B oraz na pożywce melasowej. Pożywka A zawierała 10% sacharozy, 0,5% NH_4NO_3, 0,5% KH_2PO_4, 0.25% $MgSO_4.7H_2O$, jej pH wynosiło około 4. Pożywka B (Prescott i Dunn 1949) zawierała 14% sacharozy, 0,223% NH_4NO_3, 0,1% K_2HPO_4, 0,023% $MgSO_4.7H_2O$, pożywkę tę zakwaszono kwasem solnym do pH około 2.

Węgiel dodawano przed sterylizacją w stanie powietrzno-suchym, w postaci rozdrobnionej w granicach 0,1 do 1,0 mm. Popiół z węgla otrzymywano przez spopielenie węgla w tyglach nad palnikami gazowymi. Węgiel odkationowany preparowano w ten sposób, że węgiel naturalny wielokrotnie przemywano 1/10 n HCl a następnie wodą, aż do zaniku reakcji na jony Cl. Stosowane ilości popiołu i węgla odkationowanego pochodziły zawsze z takiej ilości węgla, jakiej użyto w serii kontrolnej. Wyciągi węgla przygotowywano w ten sposób, że odważoną ilość węgla zalewano znaną ilością odczynnika i wytrząsano go przez 2 godziny na aparacie rotacyjnym. Stosowane ilości wyciągu odpowiadały zawsze ilościom węgla serii kontrolnej.

Pożywkę rozdzielano do kolb Erlenmeyera o pojemności 300 ml i sterylizowano dwukrotnie w odstępach 24-godzinnych w temperaturze 100° przez 30 minut. Posiewu dokonywano przenosząc zarodniki ezą platynową z agaru skośnego. Hodowle prowadzono w temperaturze 30°.

Po przerwaniu wegetacji grzybnię odsączano i przemywano wodą destylowaną, następnie suszono w suszarce, początkowo w temperaturze 60° a następnie 100° dla otrzymania suchej masy.

Pożywkę wraz z wodą z przemycia zbierano i po rozcieńczeniu do określonej objętości oznaczano w niej kwasowość ogólną, ilość cukru, ilość kwasu cytrynowego i kwasu szczawiowego. Odczyn oznaczano w pożywkach nierozcieńczonych wodą.

Pomiary pH przeprowadzano metodą potencjometryczną, przy użyciu elektrody chinhydronowej jako elektrody pracującej i kalomelowej jako porównawczej.

Kwasowość ogólną oznaczano przy pomocy elektromiareczkowania 1/10 n NaOH. Wyniki oznaczeń podane w mililitrach 1/10 n NaOH odnoszą się do 50 ml pożywki.

Zawartość cukru w pożywce oznaczano metodą Bertranda (1910); z oznaczeń tych obliczano ilość cukru pobraną przez pleśń.

Ilość kwasu cytrynowego oznaczano według metody Stahre'a.

Kwas szczawiowy oznaczano metodą Bernhauera (1936), zmodyfikowaną przez Wrężla (Olszewski, 1952).

Podane wyniki są średnimi arytmetycznymi 3 powtórzeń.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

1. Wpływ węgla zależnie od jego dawki

W doświadczeniu użyto pożywki A. Węgiel stosowano w ilościach 0,05, 0,15, 0,25 i 0.50 g na 50 ml pożywki. O produkcji kwasów wnioskowano na podstawie odczynu pożywki i kwasowości ogólnej. Hodowlę prowadzono przez 6 dni. Wyniki podaje tablica I.

Tablica I

Wpływ wzrastających dawek węgla na wzrost i produkcję kwasów przez *Aspergillus niger*

Влияние увеличиваемых доз бурого угля на рост и продукцию кислот *A. niger*

The effect of brown lignite on the growth and acid production in fluide cultures of *Aspergillus niger*

Po 6 dniach hodowli	Dawki węgla w gramach na 50 ml pożywki				
	0	0,05	0,15	0,25	0,50
s. m. grzybni, w g	0,315	0,470	0,699	0,983	0,797
pH pożywki	2,45	2,50	2,40	2,10	2,15
kwasowość ogólna	60,0	115,0	160,0	185,0	180,0

2. Wpływ węgla na dwa inne szczepy kropidlaka

50 ml pożywki A. 0,25 g węgla. 2 szczepy kropidlaka. O wpływie węgla na produkcję kwasów wnioskowano na podstawie odczynu i kwasowości ogólnej. 6 dni hodowli. Wyniki zebrano w tablicy II.

Tablica II

Wpływ węgla na wzrost i wytwarzanie kwasów przez 2 różne szczepy kropidlaka. *Aspergillus niger*

Влияние бурого угля на рост и продукцию кислот двумя разными штаммами *A. niger*

The effect of brown lignite on the growth and acid production in the cultures of two various strains of *Aspergillus niger*

	Szczep nr 1		Szczep nr 2	
	bez węgla	z węglem	bez węgla	z węglem
s. m. grzybni, w g	0,315	0,983	0,505	0,905
pH pożywki	2,48	2,25	2,40	2,30
kwasowość ogólna	60,0	185,0	51,0	155,0

3. Wpływ węgla na produkcję kwasu cytrynowego

150 ml pożywki A. 0.5 g węgla. 6 dni hodowli. Dla bliższego scharakteryzowania wpływu węgla, poza oznaczeniem odczynu i kwasowości ogólnej, określono ilość zużytego przez pleśń cukru oraz ilości wytworzonego kwasu cytrynowego i kwasu szczawiowego. Wyniki podaje tablica III.

Tablica III

Wpływ węgla na produkcję kwasów przez *Aspergillus niger*

Влияние бурого угля на продукцию кислот *A. niger*

The effect of brown lignite on the production of acids by *Aspergillus niger*

	Bez węgla	Z węglem
s. m. grzybni, w g	0,7856	1,5028
pH początkowe	4,41	4,94
pH po wegetacji	3,70	2,30
kwasowość ogólna początkowa	36,0	35,0
kwasowość ogólna po wegetacji	64,3	141,7
ilość zużytego cukru, w g	3,0668	5.6082
ilość cukru zużyta na wyprodukowanie 1 g s. m. grzybni	3,90	3,72
ilość wyprodukowanego kwasu cytrynowego, g	0,8709	1,8989
ilość kwasu cytrynowego w przeliczeniu na 1 g s. m. grzybni	1,10	1,26
% wykorzystania cukru zużytego przez pleśń	28,40	33,86
% wykorzystania cukru dodanego do pożywki	5,81	12,65
ilość wyprodukowanego kwasu szczawiowego, w g	0,1405	0,2527

Podobne badania przeprowadzono na pożywce A o zmniejszonej do połowy zawartości cukru (5%) oraz na pożywce B, cechującej się niższym stężeniem składników mineralnych. W obu doświadczeniach otrzymano wyniki zbliżone do wyżej podanych.

4. Wpływ węgla, węgla odkationowanego i popiołu

50 ml pożywki B, 5 dni hodowli. Do pożywek dodawano po 0.25 g węgla naturalnego lub odpowiednie ilości węgla odkationowanego, albo też popiołu. Wyniki zestawiono w tablicy IV.

Tablica IV

Wpływ węgla, węgla odkationowanego i popiołu na *Aspergillus niger*

Влияние бурого угля, золы бурого угля и бурого угля лишенного катионов на рост и продукцию кислот *A. niger*

The effect of brown lignite, of lignite devoid of kations and of lignite-ash on *Aspergillus niger*

	Sama pożywka	Węgiel	Węgiel odkat.	Popiół	Węgiel odkat. + popiół
s. m. grzybni, w g	0,540	1,080	0,860	0,780	1,185
ilość zużytego cukru, w g	2,53	5,53	3,76	3,62	5,05
ilość wytw. kwasu cytrynowego w g	0,75	1,75	1,13	0,93	1,36

5. Wpływ wyciągów z węgla

50 ml pożywki B. Do pożywek dodawano 0,25 g węgla lub odpowiednie ilości wyciągów: wodnego, alkoholowego, 1/10 n NaOH oraz 1/10 n H_2SO_4. Do pożywek kontrolnych dodawano odpowiednie ilości samych odczynników. 5 dni hodowli. Wyniki zebrano w tablicy V.

Tablica V

Wpływ wyciągów z węgla na wzrost i produkcję kwasów przez *Aspergillus niger*

Влияние экстрактов из бурого угля на рост и продукцию кислот *A. niger*

The effect of lignite-extracts on the growth and acid production by *Aspergillus niger*

	Sama pożywka	Węgiel	Wyc. H_2O	Alkohol etylowy	Wyc. alkohol	NaOH	Wyc. NaOH	Wyc. H_2SO_4
s. m. grzybni, w g	0,554	1,023	0,623	0,758	0,918	0,630	0,829	0,737
ilość zużytego cukru, w g	2,70	5,50	3,40	4,30	4,62	3,53	5,10	3,84
ilość wytworzonego kwasu cytrynowego, w g	0,50	1,00	0,59	0,87	0,89	0,50	0,90	0,88
nadwyżka w porównaniu do kontroli, w g		0,50	0,09		0,02		0,40	0,18

6. Antytoksyczny wpływ węgla

50 ml pożywki B, 0,25 g węgla, 6 dni hodowli. Żelazo dodano w postaci $FeCl_3$. 6 H_2O w ilości 3 mg na kolbę. Wyniki podano w tablicy VI.

Tablica VI

Antytoksyczny wpływ węgla w stosunku do zwiększonych ilości żelaza w pożywce

Антитоксическое влияние бурого угля по отношении к повышенному содержанию железа в среде

Antagonistic effect of brown lignite upon the toxic influence of increased amount of iron in the culture of *Aspergillus niger*

	Sama pożywka	Węgiel	Fe	Fe + węgiel
s. m. grzybni, w g	0,520	1,030	0,381	1,028
ilość zużytego cukru, w g	2,61	5,44	2,31	4,74
ilość wytworzonego kwasu cytrynowego, w g	0,78	1,68	0,57	1,14

7. Wpływ węgla na pożywce z melasem.

Jako pożywki użyto 25% roztwór melasu zakwaszony kwasem solnym do pH 6,0. Hodowla 6-dniowa. Wyniki zebrano w tablicy VII.

Tablica VII

Wpływ dodatku węgla do pożywki z melasem na wzrost i produkcję kwasów przez *Aspergillus niger*

Влияние прибавления бурого угля к среде с мелассой на рост и продукцию кислот *A. niger*

The effect of brown lignite on *Aspergillus niger* grown in the medium with molasses

	Sama pożywka	+ 0,25 g węgla	+ 0,50 g węgla
sucha masa grzybni, w g	0,673	0,538	0,516
ilość zużytego cukru, w g	4,86	4,97	4,46
ilość wytworzonego kwasu cytrynowego, w g	0,41	0,18	0,19

Podobne doświadczenia przeprowadzono na pożywce B, w której cukier zastąpiono melasem oraz na pożywce zawierającej 30% melasu i 0.01% H_3PO_4. pH tych pożywek doprowadzono do 6. W obu wypadkach dodanie węgla obniżyło ilość wytworzonego kwasu cytrynowego.

WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że:

1) Węgiel brunatny pobudza wytwarzanie kwasu cytrynowego u kropidlaka (*Aspergillus niger*). Najkorzystniejszą okazała się dawka 0.25 g na 50 ml pożywki, przy której ilość kwasu była przeszło dwa razy większa aniżeli w pożywce bez węgla.

2) Wpływ ten wywiera węgiel na oba zbadane szczepy kropidlaka.

3) Działanie węgla zaznacza się na pożywkach zawierających sacharozę, niezależnie od jej ilości (5% i 10%), od stężenia soli mineralnych (pożywka A i B) i odczynu pożywki (pH 4 i pH 2).

4) W pożywce melasowej węgiel nie tylko nie pobudza kropidlaka do wytwarzania kwasu cytrynowego, ale nawet wpływa ujemnie na ten proces. Działanie to daje się stwierdzić zarówno w czystym roztworze melasu, w jego roztworze z dodatkiem kwasu fosforowego, i w normalnej pożywce, w której sacharozę zastąpiono melasem.

5) Bliższa charakterystyka wpływu węgla dowodzi, że węgiel zwiększa ilość suchej masy grzybni, kwasowość ogólną, produkcję kwasu cytrynowego i kwasu szczawiowego, podnosi procent wykorzystania pobranego cukru dla wytworzenia kwasu cytrynowego oraz procent wykorzystania cukru dodanego do pożywki. Nie wpływa natomiast na ilość pobranego cukru oraz na wydajność produkcji kwasu w przeliczeniu na jednostkę wagową wytworzonej masy grzybni.

6) Węgiel pozbawiony kationów działa słabiej aniżeli węgiel naturalny. Popiół otrzymany po spopieleniu węgla działa jeszcze słabiej. Mieszanina węgla odkationowanego i popiołu jakkolwiek silniej pobudza produkcję kwasu aniżeli oba te składniki zastosowane oddzielnie, nie dorównuje jednak działaniu węgla naturalnego.

7) Wyciąg wodny, alkoholowy oraz 1/10 n H_2SO_4 nie mają wpływu na produkcję kwasu cytrynowego, natomiast wyciąg 1/10 n NaOH działa na ten proces korzystnie.

8) Węgiel w obecności żelaza, użytego w ilości obniżającej produkcję kwasu, łagodzi ujemny wpływ tego metalu.

DYSKUSJA

Praca nasza wykazała, że węgiel wpływa dodatnio na wytwarzanie kwasu cytrynowego przez kropidlaka. Ciekawe jest zagadnienie, na czym polega rola węgla i jakie jego składniki wchodzą tu w grę. Na podstawie zaobserwowanego korzystnego wpływu zarówno węgla pozbawionego kationów jak i popiołu, należy przyjąć, że mają tu znaczenie zarówno składniki organiczne jak i mineralne. Ponieważ jednak działanie węgla odkationowanego, a zwłaszcza popiołu, było słabsze od działania węgla naturalnego, należy przypuszczać, że dodatnio wpływa obecność obu tych składników jednocześnie. Okazało się jednak, że mieszanina tych składników nie dorównuje działaniu węgla naturalnego. Fakt ten nasuwa przypuszczenie, że mają tu znaczenie jakieś połączenia organo-mineralne. W przeciwnym bowiem przypadku jednoczesne dostarczenie pleśni składników organicznych i mineralnych (a więc węgla odkationowanego i popiołu) dawałoby taki sam efekt, co i węgiel. Istnieje tu jeszcze inne prawdopodobieństwo, a mianowicie, że substancje organiczne zawarte w węglu naturalnym różnią się od substancji zawartych w węglu odkationowanym, poddanym działaniu kwasu solnego i stąd wynika ich słabsze działanie. Wśród połączeń organicznych korzystny wpływ, być może, należy przypisać zawartej w węglu próchnicy. Ze składników mineralnych dodatnio mogą działać mikroelementy. Tomlison, Campbell i Trussel (1950) stwierdzili, że takie mikroelementy jak cynk, żelazo, mangan i miedź są konieczne dla kropidlaka, jakkolwiek produkcja kwasu cytrynowego przebiega dobrze przy takiej ilości tych składników, która nie wystarcza dla podtrzymania bujnego wzrostu grzybni. Chughtai i Walker (1951) podają, że odpowiednio drobne dawki arsenu wpływają bardzo korzystnie na fermentację cytrynową.

Na produkcję kwasu cytrynowego aktywująco działają te składniki węgla, które dają się wyługować 1/10 n NaOH. Natomiast wyciągi otrzy-

mane przy pomocy wody, alkoholu etylowego oraz 1/10 n H_2SO_4 nie wykazały wpływu na ten proces.

Ujemny wpływ żelaza na fermentację cytrynową jest zjawiskiem znanym (Kovats, 1946). Erkama, Hagerstrand i Junkkanen (1950) stwierdzili, że nawet niewielkie ilości tego metalu zmniejszają produkcję kwasu cytrynowego, zależnie od szczepu, o 60—75%. Ponieważ w poprzedniej pracy (Lityński i Jurkowska, 1952) zauważyliśmy antytoksyczny wpływ węgla wobec hamujących rozwój kropidlaka dawek miedzi, niklu a także i alkoholu etylowego, obecnie przebadaliśmy wpływ węgla na oddziaływanie żelaza podczas fermentacji cytrynowej. Jak się okazało węgiel do pewnego stopnia łagodzi szkodliwy wpływ żelaza (tabl. VI). Wynikać to może albo z sorbcyjnych własności węgla, albo też z obecności w nim jakichś składników, działających antagonistycznie w stosunku do żelaza. Przy produkcji kwasu cytrynowego na skalę techniczną, węgiel aktywowany znajduje niekiedy zastosowanie do oczyszczania melasu od szkodliwych zanieczyszczeń organicznych (Kovats, 1948).

Nieoczekiwanym dla nas zjawiskiem było działanie węgla na pożywkach melasowych (tabl. VII). Na podstawie doświadczeń z żelazem można było przypuszczać, że węgiel będzie w tym wypadku działał dodatnio. Często bowiem gorszą wydajność fermentacji cytrynowej na melasie aniżeli na cukrze przypisuje się dużej zawartości żelaza w tym substracie. Zagadnienie to wymagałoby osobnych badań, interesujących zarówno z teoretycznego, jak i praktycznego punktu widzenia. Wytworzenie bowiem warunków, w których węgiel na pożywkach melasowych zwiększałby produkcję kwasu cytrynowego, mogłoby mieć duże znaczenie.

Т. Литински, Х. Юрковска и З. Жак

ВЛИЯНИЕ БУРОГО УГЛЯ НА ПРОДУКЦИЮ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ГРИБОМ *ASPERGILLUS NIGER*

Резюме

Предметом нынешней работы является изучение влияния бурого угля на продукцию лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger*. Установлено, что под влиянием бурого угля количество получаемой лимонной кислоты увеличивается почти два раза. Стимулирующим фактором являются как минеральные, так и органические субстанции, входящие в состав угля. Полезное действие угля заключается и в том, что в нем выступают некоторые вещества, обнижающие влияние токсических факторов, что было установлено на средах, содержащих избыток железа. На мелассовой среде влияние бурого угля на продукцию лимонной кислоты отрицательно.

T. Lityński, H. Jurkowska and Z. Żak

THE INFLUENCE OF THE LIGNITE ON THE CITRIC ACID PRODUCTION BY *ASPERGILLUS NIGER*

Summary

It was proved that the production of citric acid in the cultures of *Aspergillus niger* was strongly influenced by the addition of the lignite. In the cultures with lignite, production of the acid increased twofold in comparison with the control.

This stimulating influence was exerted also by the lignite-ash and the alkali-extracts of lignite.

It is possible that the increase in acid production depends, at least partially, on the detoxicating effect of the lignite. Such detoxicating effect of the lignite was observed in the cultures of *A. niger*, in which acid production was inhibited by increased contents of iron.

In molasses-media the production of citric acid by *A. niger* was diminished by the used concentrations of the lignite.

LITERATURA

1. Bertrand G. i Thomas P.: Guide pour les manipulations de Chimie Biologique. H. Dunod et E. Pinat. Paris 1910. **2.** Chughtai M. i Wallker T.: The mechanism of the formation of organic acids by mould fungi. The influence of arsenite on *Aspergillus niger*, Biochem. J., 1951, **48**:524. **3.** Erkama J., Hagerstrand B. i Junkkanen S.: Studies on the metabolism of *A. n.* Bulletin analytique. 1950, **11**:2083. **4.** Kovats J.: Otrzymywanie kwasu cytrynowego na drodze fermentacyjnej. Przemysł Chemiczny. 1948. 6:2. **5.** Kovats J.: Wpływ temperatury na szybkość przebiegu fermentacji kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*. Przemysł Chemiczny. 1946. **7**:122. **6.** Lityński T. i Jurkowska H.: Wartość nawozowa krajowego węgla brunatnego. Przemysł Chemiczny. 1952. 1:13. **7.** Olszewski W.: Uaktywnienie fermentacji cytrynowej u pleśni *Aspergillus niger*. Prace Rolniczo-Leśne PAU. 1952. 62:1. **8.** Prescott S. i Dunn C.: Industrial Microbiology. Mc Graw-Hill-Book Co., New York 1949. **9.** Tomlison N., Campbell J. i Trussel P.: The influence of zinc, iron, copper and manganese on the production of citric acid by *A. n.* Bulletin analytique, 1950, **11**:1808.

I. M. Daszkiewicz i E. Wroński

BADANIA NAD *BRUCELLA ABORTUS* OKREŚLANIE FAZY *S* I *R*

Z Katedry Epizootiologii i Mikrobiologii Wet. UMCS

Wpłynęło dnia 20.VIII.1952 r.

Pewna i szybka metoda określania, z jaką formą (*S* czy *R*) badanego szczepu mamy do czynienia, decyduje o jego przydatności w badaniach naukowych i diagnostycznych oraz w produkcji preparatów alergicznych i szczepionek.

Celem naszej pracy było zebranie, a po sprawdzeniu ustalenie, która z wielu znanych w literaturze krajowej i zagranicznej metod określania faz *S* i *R* jest najlepszą i najpewniejszą.

Przy dysocjacji szczepów *Brucella abortus* prócz fazy *R* powstaje jeszcze wiele wariantów o odmiennej wartości antygenowej i różnej zjadliwości niż faza *S*. Są to:

Typ *SR* — jest to typ pseudo *S*, samoaglutynujący się i awirulentny. Na bulionie i podłożach stałych rośnie identycznie jak faza *S* tego samego szczepu.

Typ *RB* — kolonie o rozmiarach mniejszych niż w fazie *R* są koloru kasztanowo-brązowego. Czasem spotykamy wzrost o charakterze mukoidalnym, co uzależnione jest od pH podłoża (im wyższe pH tym częstsze są formy mukoidalne). Typ *RB* przy przesiewach łatwo daje kolonie potomne w fazie *R*. Występują one w małej ilości wśród wielu innych typów na hodowlach płytkowych, przesianych z kultur bulionowych, w których wzrost ma charakter wyraźnie nitkowaty lub śluzowy.

Typ *I* — kolonie są różnorodne; spotyka się przypominające kolonie *S* — obok niemal nie dających się odróżnić od typu *R*. Wspólną cechą kolonii *I* jest ich duży rozmiar — są one większe od kolonii *S* lub *R*. Typ ten łatwo przechodzi w fazę *S*.

Huddleson (1943) wyodrębnia dwa rodzaje typu *I* — I_1 i I_2 — opierając się na stopniu przezroczystości kolonii. Typ *OW* — Huddle-

son zaobserwował w pewnych kulturach specjalny typ kolonii, wyglądem zewnętrznym przypominający typ *R*, który łatwo przechodzi w słabo wirulentny, tworzący mało katalazy, typ *S*. Inne cechy, jak zdolność tworzenia zawiesin, własności aglutynacyjne, własności immunologiczne zbliżają go do typu *S*. Typ ten oznaczono jako *OW*. Typ *OW* nie dysocjuje na typ *R*, *RB* lub *I*, jest dobrze zawieszalny w roztworze fizjologicznym i aglutynuje łatwo z surowicami swoistymi. Kolonie jego po 48 godz. stają się nieprzezroczyste, a po następnych 48 godz. inkubacji pojawia się blado-zielone, klinowate żyłkowanie rozszerzające się od środka ku brzegom i wystające poza granice kolonii. Typ *OW* inkubowany w obecności 10% CO_2 daje 75% kolonii typu *S*. Otrzymanie typu *OW* bez domieszki małej ilości fazy *S* jest niemożliwe. Zarówno mechanizm dysocjacji jak i ich istota nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione.

Hadley (1927—1937) uważa dysocjacje za zmiany właściwe normalnemu rozwojowi cyklogenicznemu.

Mayer (1938), Reed (1940), Dubos (1945) interpretowali zmiany zachodzące w czasie dysocjacji jako mutacje, przypisując zasadniczą rolę doborowi.

Hinshelwood i Lodge (1944) wykazali bezpośredni wpływ środowiska na dysocjację szczepów oraz powstawanie modyfikacji pod wpływem otoczenia.

Braun (1946) we wstępnym doniesieniu o czynnikach wpływających na dysocjację bakterii, uznał wrodzone różnice pomiędzy szczepami za przyczynę różnej szybkości i nasilenia dysocjacji oraz różnego reagowania na czynniki zewnętrzne. Wykazał on wpływ pH środowiska na dysocjację; i tak odczyn kwaśny (pH 6.6) przyspiesza dysocjację, przy pH 8 dochodzi do równowagi, zaś środowisko silnie alkaliczne (pH 8.6) wstrzymuje dysocjacje. Przy stałym pH, odsetek kolonii zdysocjowanych stale wzrasta i osiąga maksimum około dziesiątego dnia hodowli. Braun wykazał że na stopień dysocjacji wyraźny wpływ mają również inne czynniki, jak rodzaj środowiska (płynne czy stałe) oraz ciśnienie i temperatura.

Przy badaniach nad dysocjacją spostrzeżono, że normalna surowica zwierząt wrażliwych na brucellozę wpływa na wskaźnik dysocjacji (ID — Indeks Dysocjacji — wskaźnik dysocjacji, jest to procentowa ilość typów nie *S* w dziesięciodniowych kulturach bulionowych wywodzących się z fazy *S*). Szczep *S* dający normalnie 35% typów *R* i *M*, po dziesięciu dniach hodowania na bulionie buforowym o pH — 6.8 z dodatkiem 4% normalnej surowicy zwierzęcia wrażliwego na brucellozę, pozostał wy-

łącznie w fazie *S*. Własność ta uwarunkowana jest obecnością w surowicy czynnika *SS*.

Cole (1950) stwierdził, że surowica zwierząt opornych na brucellozę — nie hamuje wzrostu fazy *R*, a działanie wybiórcze surowicy bydlęcej wykryte przez Brauna spowodowane jest obecnością w niej dwu odrębnych protein:

a) γ globuliny

b) kompleksu lipo-proteinowego.

Cole i Braun (1950) podają, że zahamowanie przejścia fazy *S* w *R* następuje również i wtedy, gdy do pożywki dodamy pirofosforanu sodu ($Na_4P_2O_7$) w stosunku 0,2 ml 0,33 n pirofosforanu sodu na 5 ml pożywki.

Czerniczewa (1950) donosi, że badacze radzieccy zaobserwowali przechodzenie fazy *S Brucella* w fazę *R* również w organiźmie człowieka (przy zabiegach leczniczych). Jak podaje Czerniczewa-Orłow, Moriakowa Dorofiejew, Putimow, stwierdzili znaczną zjadliwość szczepu Buck-19. Spostrzegli także, że wszystkie kultury wyizolowane z węzłów chłonnych były typowymi formami *S* szczepu Buck-19, podczas gdy wyizolowane z wątroby były formami *R*.

BADANIA WŁASNE

W badaniach dokonywanych w naszym zakładzie stosowaliśmy pięć metod sprawdzając w ten sposób czterokrotnie 51 szczepów laboratoryjnych *Brucella abortus*. Szczepy nr nr 8, 9 i 15 są szczepami Buck-19, szczepy nr nr 68—77 są szczepami biliowanymi na żółci (numer odpowiada kolejnemu pasażowi), szczep Nr 80 jest szczepem świeżo wyizolowanym z przypadku w terenie. Wyniki są ujęte w tabl. I.

METODY BADAŃ

1. Termoaglutynacja wg Burneta (1928)

Trzydniową hodowlę spłukuje się płynem fizjologicznym, a następnie gotuje przez 2 godz. Odczytu dokonujemy raz tuż po gotowaniu, drugi raz na następny dzień — po pozostawieniu gotowanych spłuczyn w temperaturze pokojowej. Szczepy *S* dają zawiesinę jednolicie mętną, przy szczepach *R* na dnie probówki powstaje osad, płyn zaś nad nim — pozostaje klarowny.

2. Aglutynacja z fuksyną zasadową — Di Aichelburga (wg Huddlesona, 1943)

Jedno do dwu-dobową hodowlę agarową zawieszamy w wodnym roztworze fuksyny zasadowej (1:2000) i wstawiamy na 2 godz. do termostatu przy 37°. Szczepy *R* i inne warianty aglutynują w różnych stopniach już po upływie 5 minut. Szczepy *S* zostają jednolicie zawieszone.

Tablica I

Aglutynacja z szczepami muzealnymi

Сравнительная оценка методов дифференцирования фаз S и R в культурах *Br. abortus*.
Лабораторные штаммы

The differentiation of S and R phases in *Br. abortus*. Laboratory collection strains.

Nr Nr szczepów	Termoaglutynacja I				Aglutynacja akryflawinowa rozc. 1 : 1000 III				Aglutynacja z fuksyną zasadową 1 : 2000 II			Aglutynacja rivanolowa 0,2% IV			Procentowy stosunek kolonii „R" i „S" na pożywce Brauna z fiol. kryst. rozc. 1:2000 V	
	Data dokonywania odczynu														29.III.52	
	26.XI.51	5.I.52	29.II.52	29.III.52	26.XI.51	5.I.52	29.II.52	29.III.52	30.XI.51	15.I.52	29.III.52	30.XI.51	15.I.52	29.III.52	Faza „S"	Faza „R"
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+ —	+ —	+ —	98	2
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+ —	+ —	+ —	96	4
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+ +	+	+ +	97	3
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+	+ —	+ —	+	98	2
5	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+ +	95	5
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	96	4
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	97	3
8	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	99	1
9	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+	+ —	+	+	+ +	+ +	78	22
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ +	+ —	95	5
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+	+ —	96	4
12	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	+ +	99	1
13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+ —	+ —	99	1
14	—	+ —	+ —	+ —	—	—	—	—	+ —	+ —	+	+	+ —	+ +	60	40
15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+	+ +	100	—
16	—	+ —	+ —	+ —	—	—	—	—	+ —	+	+	+ —	+ —	+ +	81	19
17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ +	+ +	+ —	100	—
18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+ —	+ —	+	+ —	100	—
19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+	+ —	+ —	+ —	100	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ —	+	+ —	+ —	+ —	98	2

| | | |

3. Aglutynacja akryflawinowa (trypaflawinowa) wg Alessandriniego i Sabatucciego (1931)

Próbę można stosować w dwu odmianach: makroskopowej i mikroskopowej.

Próba makroskopowa

Bierzemy roztwór akryflawiny zasadowej lub obojętnej o stężeniu 1:1000 oraz 2—4-dniową hodowlę, którą spłukujemy płynem fizjologicznym o pH-7. Przy próbie nie należy: zeskrobywać ezą hodowli, zbyt długo spłukiwać hodowlę agarową, lub używać hodowli starszych niż 5-cio dniowych, gdyż są to czynniki mogące spowodować fałszywe wyniki (cząstki agaru — obumarłe drobnoustroje). Do probówek aglutynacyjnych dajemy 1 ml zawiesiny badanej (w płynie fizjologicznym o pH 7.0) i 0.1 ml roztworu zasadowej lub obojętnej akryflawiny (1:1000). Przy szczepach fazy *S* zawiesina pozostaje jednolicie mętna, przy szczepach zaś w fazie *R* (lub innych wariantach) prawie natychmiast powstaje w probówce aglutynacyjnej kłaczkowaty osad. Po 1—2 godz. w temperaturze pokojowej osad opada na dno.

Ardrey, zauważył, że aglutynacyjne działanie akryflawiny uzależnione jest od środowiska: jeśli zamiast roztworu soli do zawieszania bakterii użyć wody destylowanej — aglutynacji ulegną szczepy *S*.

Próba mikroskopowa

Na szkiełku podstawowym rozcieramy wybraną kolonię z jedną kroplą płynu fizjologicznego na jednolitą zawiesinę, a następnie dodajemy jedną kroplę roztworu akryflawiny 1:1000 i dokładnie mieszamy ezą lub bagietką.

4. Aglutynacja rivanolowa wg Zagrodzkiego (1938)

Do probówek aglutynacyjnych dodajemy po 2 ml spłuczyny 24-godzinnej agarowej hodowli i 0,5 ml 0,2% wodnego roztworu Rivanolu, wstrząsamy i wstawiamy na 24 godz. do termostatu przy 37 °, a następnie odczytujemy. Wg autora odczyn ten pozwala na wykrycie nawet 2—10% domieszki fazy *R*.

5. Próba Henry'ego, zmodyfikowana przez Brauna (wg White'a i Wilsona 1951)

Próba ta pozwala na szybkie rozróżnienie kolonii, które przy użyciu zwykłych metod wyglądają niemal identycznie i daje wyniki zgodne z odczynem akryflawinowym (wg Brauna i Bonestella, 1947).

Przy wykonywaniu odczynu stosuje się:

a) pożywkę o składzie: 2.5% agaru z dodatkiem 1% glukozy i 5% glicerolu,

b) wodny roztwór fioletu krystalicznego 1:2000.

Na dobrze wysuszone płytki agarowe wysiewa się hodowlę i inkubuje w termostacie przy 36° przez 96 godzin — po czym płytki z hodowlą zalewa się na okres 15 sekund roztworem fioletu krystalicznego w wodzie destylowanej (1:2000). Nadmiar barwika zlewa się ostrożnie, ogląda płytkę przy małym powiększeniu. Różnice w wyglądzie między koloniami *S* i *R* utrzymują się do 96 godzin. Kolonie w fazie *S* barwią się na kolor jasno-błękitno-zielony, kontrastujący z jasnofioletowym tłem. Kolonie w fazie *R* barwią się na kolor czerwony do błękitno-czerwonego. Kolonie *S* po pewnym czasie nabierają na obwodzie stopniowo ciemniejszej barwy błękitno-fioletowej. Wśród wariantów zaobserwowano trzy różne zabarwienia: a) typowo szorstkie kolonie, były fioletowo-czerwone, b) najbardziej śluzowate, były jasno-niebiesko-czerwone, c) szczep śluzowaty *Br. suis* (Huddlesona), był ciemno-purpurowo-niebieski. Różniczkowanie jest też możliwe przy użyciu agaru zwykłego, lecz dodatek 1% glukozy i 5% glicerolu wydatnie zwiększa różnice barwne między koloniami szorstkimi i śluzowatymi. Jak podaje autor, reakcje barwne zależą też od koncentracji barwika i czasu jego działania, np. fiolet krystaliczny w stężeniu 1:400, umożliwiał dobre różnicowanie w ciągu 4 sekund faz *R* i *S*, natomiast nie wyróżniał fazy *M* od *R*. Prócz fioletu krystalicznego używano innych barwików. Dobre rezultaty dawała safranina „O". Gładkie kolonie były bezbarwne lub słaboceglaste, podczas gdy szorstkie miały barwę żywo-czerwono-pomarańczową. Safranina „O" nie dawała jednak możności odróżniania odmian szorstkich od śluzowatych. Z pozostałych, użytych do prób barwików, eozyna i zieleń brylantowa dawały słabe różnice, zaś fuksyna kwaśna, zieleń metylowa, czerwień Kongo, brąz Bismarcka, zieleń malachitowa i sudan czarny „B" nie nadawały się do odczynu.

Metoda ta pozwala na ustalenie procentowego stosunku kolonii *S* do *R* lub innych wariantów.

Metodą Brauna przebadaliśmy dwa szczepy laboratoryjne nr nr 2 i 21 oraz szczepy biliowane *Brucella abortus* (pasaże nr nr 68 — 77 włącznie), wyizolowując tą metodą z każdego szczepu fazę *S* i *R* osobno. Tak wyosobnione fazy sprawdzono przy pomocy prób I, II, III i IV. Wyniki ujęto w tabl. II.

Poza tym przebadaliśmy wpływ pH podłoża na dysocjację na szczepach nr nr 2, 5, 9, 16, 21, 68, 75, 76 i 77. Hodowlę przeprowadzano

Tablica II

Porównawcza ocena metod różnicowania faz S i R *Br. abortus*.

Fazy S i R wyizolowane metodą Brauna.

Сравнительная оценка методов дифференцирования фаз S и R *Br. abortus*.

Чистые фазы S и R выделенные по чашечному методу Брауна

The differentiation of *S* and *R* phases in *Br. abortus*. *S* and *R* phases isolated by Brown's method.

Fazy „S" i „R" szczepów wyizolowane na pożywce Brauna	Termoaglutynacja	Aglutynacja akryflawinowa 1:1000	Aglutynacja z fuksyną zasadową 1:2000	Aglutynacja rivanolowa 0,2%	% stosunek kolonii „R" i „S" na pożywce Brauna z fiol. kryst. 1:2000	
	I	II	III	IV	V	
	3.IV.52	3.IV.52	3.IV.52	3.IV.52	3.IV.52	
					Faza „S"	Faza „R"
2 — S	—	—	+ —	+ —	100	—
2 — R	+	+	+	+ +	3	97
21 — S	—	—	+ —	+	100	—
21 — R	+	+	+	+ +	2	98
68 — S	—	—	+ —	+ —	100	—
68 — R	+	+	+	+ +	32	68
69 — S	—	—	+ —	+	98	2
69 — R	+	+	+	+ +	17	83
70 — S	—	—	+ —	+	98	2
70 — R	+	+	+	+ +	12	88
71 — S	—	—	+ —	+ +	97	3
71 — R	+	+	+ —	+ +	72	28
72 — S	—	—	+ —	+ +	98	2
72 — R	+	+	+	+ +	13	87
73 — S	—	—	+ —	+ +	99	1
73 — R	+	+	+	+ +	11	89
74 — S	—	—	+ —	+ +	98	2
74 — R	+	+	+	+ +	9	91
75 — S	—	—	+ —	+ +	94	6
75 — R	+	+	+	+ +	32	68
76 — S	—	—	+ —	+ +	97	3
76 — R	+	+	+	+ +	—	100
77 — S	—	—	+ —	+ +	98	2
77 — R	—	—	—	+ —	7	93

Ocena jak w tabl. I.

przez okres 10 dni na bulionie o pH 6,6 przyśpieszającym wg Brauna dysocjację. Tak inkubowane szczepy przebadano następnie przy pomocy prób I—V. Wyniki ujęto w tabl. III.

Tablica III

Wpływ pH podłoża na stopień dysocjacji

Влияние pH среды на диссоциацию

The effect of pH on the dissotiation rate

Nr Nr szczepów hodowanych przez 10 dni w bulionie o pH—6,6	Termoaglutynacja	Aglutynacja akryflawinowa 1:1000	Aglutynacja z fuksyn. zasadową 1:2000	Aglutynacja rivanolowa 0,2%	% stos. kol. „R" i „S" na pożyw. Brauna z fiol. kryst. 1:2000		Ilość % form „S" i „R" przed hodowlą na bulionie o pH—6,6	
					„S"	„R"	„S"	„R"
2	+	+	+	+ +	3	97	96	4
5	+ —	+ —	+	+ +	79	21	95	5
9	+	+	+	+ +	9	91	78	22
16	+	+	+	+ +	17	83	81	19
21	+	+	+	+ +	10	90	84	16
47	+ —	+ —	+ —	+	80	20	98	2
68	+	+	+	+ +	52	48	82	18
75	+	+	+	+ +	22	78	81	19
76	+	+	+	+ +	11	89	81	19
77	+	+	+	+ +	30	70	79	21

OMÓWIENIE I WNIOSKI

Jak wynika z analizy tabl. I, wyniki termoaglutynacji w zasadzie pokrywają się z wynikami próby akryflawinowej. Odczyny z fuksyną zasadową i Rivanolem wypadają prawie zawsze dodatnio — nawet wówczas, gdy dwie poprzednie fazy wskazują na obecność zupełnie czystego typu *S* (szczepy nr nr 15, 17, 18, 19, 80). Próba Brauna z fioletem krystalicznym pozwala na wykrycie komórek w fazie *nie-S*, nawet gdy ilość ich nie przekracza 1%. Próba ta daje wyniki bardziej zbliżone do wyników termoaglutynacji i aglutynacji akryflawinowej, niż aglutynacja z fuksyną zasadową lub Rivanolem. Badania ujęte w tabl. II nad wyosobnionymi czystymi fazami *S* i *R*, poddanymi ponownie próbom jeszcze dobitniej potwierdzają ten wniosek. Widoczna jest zgodność wyników termoaglutynacji i aglutynacji akryflawinowej z wynikami, otrzymanymi przy pomocy metody Brauna.

Analizując tabl. III widzimy, że 10-dniowa hodowla w środowisku o pH 6,6 przyśpiesza dysocjację większości badanych szczepów. Na dziesięć szczepów hodowanych w środowisku o pH 6,6 u 3 nie stwierdzono zwiększenia wskaźnika dysocjacji.

Z przytoczonych wyżej wyników badań, należałoby wysnuć następujące wnioski:

1. Żadna z podanych wyżej metod określania fazy *S* i *R*, użyta oddzielnie nie daje zupełnej pewności.

2. Test Di Aichelburga oraz aglutynacja rivanolowa wypadają prawie zawsze dodatnio, nawet przy szczepach znajdujących się w czystej fazie *S*. Z uwagi na powyższe nie należałoby stosować ich przy określaniu dysocjacji badanych szczepów.

3. Najlepsze wyniki dają: aglutynacja akryflawinowa, a częściowo i termoaglutynacja — sprawdzone równocześnie metodą Brauna.

4. Metoda płytkowa Brauna, poza wartością diagnostyczną, pozwala ponadto na ponowne odtworzenie szczepu w czystej fazie *S* z hodowli już zdysocjowanej (pod warunkiem, że dysocjacja nie jest jeszcze 100%).

5. Istnieje pewna ilość szczepów *Brucella abortus*, u których wskaźnik dysocjacji nie ulega zmianie pod wpływem odczynu i konsystencji środowiska.

И. М. Дашкевич и Э. Вронски

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД *BRUCELLA ABORTUS*: ОПРЕДЕЛЯНИЕ ФАЗ „S" и „R"

Резюме

Для установления, который метод из многих известных методов определяния фаз „S" и „R" является самым лучшим и надежным, авторами было исследовано четыре раза 51 штаммов *Brucella abortus bovis*, пользуясь ниже следующими методами

Термоагглютынация по Бэрнету.
Агглютынация щелочным фуксином — проба Du — Айхельбурга.
Агглютынация акрифлавином по Алесандрини и Сабатучи.
Агглютынация риванолом по Загродскому.
Чашечный метод Брауна кристалическим фиолетом.

На основании полученных результатов (табл. I и II) следовало бы прийти к ниже следующим выводам:

1. Проба Du - Айхельбурга, а также агглютынация риванолом оказыва тся почти всегда положительной, даже у штаммов, находящихся в 100% в фазе „S". В виду этого эти методы непригодны для дифференцияции фаз „S" и „R".

2. Найлучшие результаты получаются при применении агглютынации акрифлавином а также и частично, термоагглютынации. Рекомендуется одновременно проверку по чашечному методу Брауна с употреблением кристаллического фиолета.

3. Чашечный метод Брауна дает возможность получить штаммы в чистой фазе „S, даже и в том случае, когда в культуре выступает очень ничтожное количество клеток находящихся в этой фазе.

I. M. Daszkiewicz and E. Wroński

THE DIFFERENTIATION OF *S* AND *R* PHASES IN *BRUCELLA ABORTUS*

Summary

Fifty one strains of *Br. abortus* were investigated for evaluating various methods of differentiation of *S* and *R* phases.

Following methods were used: 1) thermoagglutination (Burnet), 2) basic fuchsine agglutinaton (Di Aichelburg), 3) acriflavine agglutination (Alessandrini and Sabattucci), 4) Rivanol agglutination (Zagrodzki) and 5) crystal violett agar plate technique (Brown).

Agglutination with basic fuchsine and with Rivanol was positive even in strains in almost 100% S-phase (as evaluated by Brown's method). It seems that these tests should be abandoned.

The results obtained in acriflavine agglutination, and to the less extent in thermoagglutination were in accordance with the results of Brown's test (Tables I and II).

LITERATURA

1. Alessandrini A. i Sabatucci M.: Trypaflavine (acriflavine) for the differentiation of cultures genus *Brucella*. Annali d'igiene, 1931, **41**:29. **2.** Andrey W. B. cyt. wg Huddlesona, 1943. **3.** Braun W.: Dissociation in *Brucella abortus*: A demonstration of the role of inherent and enviromental factors in bacterial variation. J. Bact. 1946, **51**:327. **4.** Braun W. i Bonestall A. E.: Independent Variation of Characteristics in *Brucella abortus* Variants and Their Detection. Am. J. of Vet. Research, 1947, **8**:386. **5.** Burnet E. T.: The termoagglutination and the evaluation of the species of *Brucella*. Arch. de l'Inst. Past. de Tunis, 1928, **17**:128. **6.** Cole L. J. i Braun W.: The effect of Ions of Mn and Mg on the Variation of *Brucella abortus*, J. of Bact., 1950. **60**:283. **7.** Cole L. J.: Purification of the Bovine γ — globulin Facton which Suppresses Variation in *Brucella abortus*. J. Immunol., 1950, **65**:485. **8.** Czerniczewa M. J.: Wytwarzanie barwika w kulturach *Brucella*. Wietierinaria, 1950. 9:52. **9.** Dubos R.: Bakterialna kletka, tłum. ros. ANSSSR. Moskwa 1950. **10.** Huddleson I. F.: Brucellosis in Man and Animals. Oxford University Press, London 1943. **11.** Hadley P.: cyt. wg Brauna, 1946. **12.** Hinshelwood C. M.: cyt. wg Brauna, 1946. **13.** Mayer H. D.: (1938) cyt. wg Brauna, 1946. **14.** Reed G. B.: (1938) cyt. wg Brauna, 1946. **15.** White F. G. i Wilson J. B.: Notes on the differentiation of smooth and nonsmooth colonies of *Brucella*. J. Bact. 1951. **61**:239. **16.** Zagrodzki K.: Nowa metoda różnicowania szczepów *R* i *S Brucella bovis* drogą nieswoistego wypadania. Pamiętniki P.I.N.G.W. — 1938. zeszyt **2**:14.

Acta Microbiologica Polonica, Vol. 1, No 4

J. Gołębiowska i T. Wróbel

PRZYDATNOŚĆ RÓŻNYCH PODŁOŻY DO PRODUKCJI SZCZEPIONEK DLA ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Z Działu Mikrobiologii Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Wpłynęło dnia 22.VIII.1952 r.

WSTĘP

Z chwilą gdy zaczęto doceniać znaczenie symbiozy roślin motylkowych z bakteriami, rozpoczęto liczne badania nad możliwością uaktywnienia tej symbiozy a w ten sposób zwiększenia energii wiązania azotu.

Jednym z podstawowych zadań w tym zakresie stało się zapewnienie roślinom motylkowym możności współżycia z rasami bakterii, które by z łatwością rozwijały się w odpowiadających im roślinach i energicznie przyswajały wolny azot.

W tym celu podjęto produkcję szczepionek dla różnych roślin motylkowych. Materiałem matecznym przy ich wyrobie były sprawdzone hodowle laboratoryjne odpowiednich bakterii brodawkowych.

Szczepionki takie po raz pierwszy zostały wyprodukowane przez Nobbego i Hiltnera w 1896 r. przez rozmnożenie bakterii na żelatynie. W miarę rozwoju badań nad bakteriami brodawkowymi stopniowo udoskonalano produkcję szczepionek. Obecnie dobra szczepionka odpowiadać musi następującym zasadniczym warunkom:

1. Szczepionka musi być rozmnożeniem takiego szczepu bakterii, który odznacza się dużą zdolnością wiązania azotu w symbiozie z odpowiadającą mu rośliną motylkową.

2. Podłoże szczepionki powinno zapewnić szybkie i silne rozmnożenie się w nim bakterii, bez utraty wirulencji i aktywności szczepu macierzystego.

3. Gotowa szczepionka musi być prosta w użyciu i łatwa do transportu.

4. Szczepionka powinna znosić kilkumiesięczne przechowanie, zachowując wszystkie cechy dobrego preparatu.

Ze względów ekonomicznych dąży się zarazem do obniżenia kosztów produkcji, używając do niej tanich i łatwo dostępnych surowców.

Jak już wspomniano, pierwsze szczepionki produkowano na podłożu żelatynowym. Jednakże jak się okazało, żelatyna nie jest środowiskiem selektywnym dla bakterii brodawkowych i ze względu na dużą zawartość azotu niekorzystnie wpływa na zdolność wiązania azotu. Dlatego też prędko wyszła z użycia, ustępując miejsca podłożom agarowym i płynnym o różnym składzie chemicznym. Bardzo wcześnie zastosowano też jako podłoże dla szczepionek sterylizowaną glebę. Już w roku 1896 K ü h n produkował w Niemczech szczepionki składające się z zawiesiny bakterii zmieszanej z wyjałowioną glebą. Z czasem, prócz gleby, jako podłoże naturalne dla rozmnożeń bakterii brodawkowych zaczęto stosować torf lub piasek. I z r a i l s k i (1933), stwierdziwszy, że bakterie brodawkowe znoszą przesuszenie i nie tracą w tym stanie swej aktywności, próbował wyrabiać „suchą nitraginę", przygotowując ją z wysuszonych i sproszkowanych brodawek zmieszanych ze sterylizowanym talkiem P o t a p o w (1946) próbował wytwarzać nitraginę, używając jako podłoża mieszaniny gleby z pożywką agarową.

W Czechosłowacji wytwarza się obecnie szczepionki na podłożu krzemionkowym (1950).

Z tych różnych podłoży najpowszechniej obecnie stosowane są podłoża glebowe i agarowe.

BADANIA WŁASNE

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie przydatności różnych podłoży do przygotowania szczepionek dla roślin motylkowych.

Zajęliśmy się przede wszystkim sprawą podłoża jako środowiska o różnych własnościach fizycznych, starając się rozwijającym się bakteriom zapewnić optymalne i możliwie jednolite warunki pokarmowe. W niektórych przypadkach, dla zbadania czy na wszystkich podłożach bakterie jednakowo silnie reagują na zmianę składu chemicznego pożywki, stosowano różny sposób odżywiania bakterii.

Jako podłoże dla szczepionek stosowano: pożywkę agarową, pożywkę płynną, glebę, torf i piasek.

W szczepionkach przygotowanych na tych podłożach porównywano stopień rozwoju i żywotność bakterii brodawkowych. Obok tego spraw-

dzano wartość tych szczepionek w doświadczeniach wegetacyjnych z odpowiednimi roślinami motylkowymi.

Doświadczenia prowadzono w 1949 i 1951 r. Szczepionki do doświadczeń przygotowywano na szczepach, pochodzących z kolekcji Działu Mikrobiologii I.U.N.G. w Puławach. W pierwszym doświadczeniu (1949) badano szczepionki *Rh. meliloti* (szczep „Th"), *Rh. japonicum* (szczep 94) i *Rh. leguminosarum* (szczep 1) oraz ich wpływ na odpowiadające im rośliny. W drugim doświadczeniu (1951) przedmiotem badań były szczepionki *Rh. meliloti* (szczep Th) i *Rh. trifolii* (szczep 4) oraz ich wpływ na lucernę i koniczynę.

I ROK DOŚWIADCZENIA

OPIS DOŚWIADCZENIA

Szczepionki przygotowano w sposób następujący:

Szczepionki płynne — bezazotową pożywką mineralną (skład pożywki: K_2HPO_4—1,0 g; $MgSO_4 . 7 H_2O$—0,2 g; $CaCl_2$—0,1 g; NaCl—0,1 g; $FeSO_4$ 0,02 g; $MnSO_4$ — ślady; $CaCO_3$ –5,0 g; mannit lub sacharoza — 10,0 g; woda drożdżowa 100 ml; uzupełnia się wodą wodociągową do 1 ltr.; pH około 7,0 (rozlewano do 100 mililitrowych erlenmeyerek w ilości po 30 ml na każdą kolbkę.

Szczepionki agarowe — pożywkę o tym samym składzie co pożywka płynna, z dodatkiem 1,5% agaru, zestala się w płaskich 200 ml flaszkach na leżąco, przez co otrzymuje się na bocznej ściance flaszki dużą powierzchnię agaru.

Szczepionki glebowe — użyto trzy rodzaje podłoży: glebę, szczerk mało próchniczny; torf niski, pH ok. 6,6; piasek kwarcowy, wydmowy z dodatkiem 5% węgla. Wsypano je w takiej ilości do erlenmeyerek o pojemności 100 ml, by grubość warstwy gleby wynosiła około 1 cm (potrzeba na to około 27 g szczerku, 15 g torfu lub 32 g piasku). Kolbki z glebą i torfem wyjałowiono w autoklawie. Sterylizowano naczynia z glebą przez dwa dni z rzędu, stosując temperaturę 120° w ciągu 3 godzin. Piasek prażono przez 2 godz. w temp. 160°. Do tak przygotowanych podłoży dodawano płynną bezazotową pożywkę mineralną oraz mannit lub sacharozę w ilości odpowiadającej zawartości składników pokarmowych w 25 ml płynnej pożywki mineralnej. Podłoże piaskowe otrzymało ponadto po 2 ml wody drożdżowej na kolbkę. Wilgotność podłoży glebowych wynosiła około 50% nasycenia ich całkowitej pojemności wodnej.

Pożywkę płynną, agarową i glebową szczepiono zawiesiną bakterii, przygotowaną z 4-dniowych hodowli agarowych na pożywce syntetycznej z mannitem lub z sacharozą. Wzrost bakterii zmywano ze szczepionki macierzystej wyjałowioną wodą destylowaną. Do każdej flaszki ze szczepionką wprowadzano po 1 ml zawiesiny o znanej ilości bakterii. Ilość bakterii wprowadzonych do każdej flaszki obliczano za pomocą komory Thoma. Szczepionki rozmnażano w cieplarce w temp. 28°, dla grochu przez 8 dni, dla lucerny przez 10 dni, dla soi przez 20 dni.

Ilość bakterii w gotowych szczepionkach obliczano po wymienionym czasie, posługując się metodą płytkową z zastosowaniem pożywki agarowej z mannitem i z wodą drożdżową.

Poza obliczeniem ilości komórek zwrócono też uwagę na cechy morfologiczne bakterii w poszczególnych szczepionkach, sprawdzając je w trwałych preparatach mikroskopowych barwionych erytrozyną fenolową.

W celu skontrolowania aktywności szczepionek przygotowanych na różnych podłożach przeprowadzono doświadczenia wegetacyjne z grochem, lucerną i soją. Doświadczenia założono w wazonach z 10 kg czystego piasku, w 6 powtórzeniach w każdej kombinacji. Wszystkie wazony otrzymały pełne nawożenie mineralne bez azotu. Odczyn piasku w wazonach utrzymywano w granicach pH 6,5—7,0; wilgotność w okresie wegetacji wynosiła 50% całkowitej pojemności wodnej piasku.

Doświadczenie prowadzono ze szczepieniem grochu, łubinu żółtego i soi szczepionkami świeżymi i po dwumiesięcznym ich przechowaniu.

Ilość szczepionki potrzebnej do zaszczepienia nasion przeznaczonych do wysiewu w 1 wazonie obliczano wychodząc z założenia, że na 1 ha, to jest np. na 160 kg grochu używa się 4 flaszki szczepionki. Ponieważ 10 ziarn grochu waży przeciętnie 5 g — na 1 wazon wypadałoby użyć 1/8000 flaszki szczepionki. Przyjmując, że żywotność bakterii w wazonie jest mniejsza niż w glebie użyto 0,001 flaszki szczepionki na wazon, przygotowując z niej odpowiednie rozcieńczenie i spryskując nią ziarno przeznaczone do wysiewu. Podobne doświadczenia przeprowadzono dla lucerny i dla soi.

Sprzęt roślin w tym doświadczeniu wazonowym odbywał się w dwóch terminach. Po 2 wazony sprzątano przed kwitnieniem roślin, pozostałe cztery w okresie dojrzewania.

WYNIKI

Badanie szczepionek. Szczepionki w tym doświadczeniu zawierały dość znaczne ilości bakterii prawie na wszystkich podłożach. Liczebność ich zestawiono w tabl. I.

Widzimy, że stosunkowo najsłabiej rozwinęły się bakterie na podłożu piaskowym. Tłumaczy się to złymi warunkami fizycznymi. Grube ziarna piasku tworzą małą powierzchnię zbiorową tego podłoża, mimo że dodano do piasku pyłu kaolinowego.

Na podłożu płynnym i agarowym *Rh. leguminosarum* rozwijało się bardzo dobrze, natomiast dla *Rh. meliloti* stosowniejsze były podłoża glebowe. Specjalnie złym podłożem dla *Rh. meliloti* okazała się pożywka płynna z sacharozą. Prawdopodobnie sacharoza źle jest przyswajana przez ten gatunek bakterii. Możliwe też, że przy rozkładaniu tego cukru powstają takie produkty przemiany materii, które hamują dalszy rozwój bakterii. Na podłożach glebowych wpływ tych substancji może być łatwiej neutralizowany, natomiast na podłożu agarowym, a zwłaszcza na podłożu płynnym, zaznacza się bardzo silnie.

Nie oznaczono ilości żywych komórek w szczepionkach dla soi. Liczenie takie jest dość trudne, gdyż przy wysiewie małej ilości *Rh. japonicum* w rozcieńczonych zawiesinach nie następuje wzrost kolonii. Rozwój ich

Tablica I *

Wpływ rodzaju podłoża na liczebność *Rhizobium* w szczepionce

Влияние рода употребляемых сред на количество клеток *Rhizobium* в бактериальном препарате

The influence of the kind of a medium on the number of root nodule bacteria in preparation for inoculation of plants

Nazwa szczepu *Rhizobium*	Źródło węgla w pożywce	Rodzaj podłoża w szczepionce	Początkowa ilość bakterii	Ilość bakterii w gotowej szczepionce	Wskaźnik rozmnożenia
			w miliardach		
Rh. leguminosarum szczep nr 3	mannit	płynne	0,08	12,6	157
		agarowe		9,4	117
		gleba		9,3	116
		torf		9,3	116
		piasek		7,8	97
	sacharoza	płynne	0,04	4,7	142
		agarowe		14,7	370
		gleba		8,2	205
		torf		17,7	442
		piasek		2,0	50
Rh. meliloti szczep Th	mannit	płynne	0,12	7,7	64
		agarowe		4,1	34
		gleba		13,7	114
		torf		—	—
		piasek		12,6	105
	sacharoza	płynne	0,12	0,4	3
		agarowe		4,0	33
		gleba		11,7	97
		torf		15,7	131
		piasek		3,5	29

hamowany jest prawdopodobnie przez brak substancji wzrostowych, na których obecność ten gatunek bakterii jest specjalnie wrażliwy.

Przy obserwacji bakterii z różnych szczepionek w preparatach mikroskopowych stwierdzono, co następuje:

Wygląd komórek *Rh. leguminosarum* nie różnił się na poszczególnych pożywkach. Tylko na pożywkach płynnych obserwowano wyraźne wydłużanie się komórek i pojawianie się form zniekształconych (rys. 1).

U *Rh. meliloti* komórki, które wyrosły na sacharozie, były drobniej-

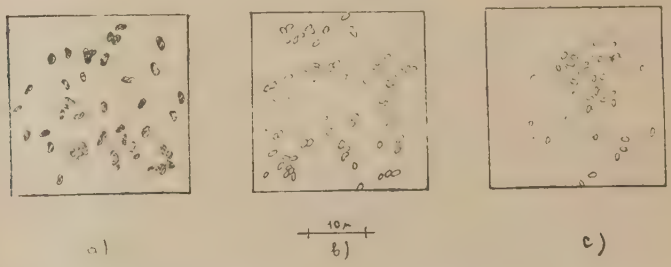
szo i słabiej barwiące się niż na mannicie. Największe komórki (do 4 μ) obserwowano na podłożu agarowym z mannitem (rys. 2).

Obserwując *Rh. japonicum* w preparatach mikroskopowych, stwierdzono, że charakterystyczne kształty komórek tych bakterii i właściwe

Rys. 1. — *Rh. trifolii* w hodowlach na różnych podłożach z sacharozą: a) w szczepionce agarowej, b) w szczepionce płynnej, c) w szczepionce glebowej.

Рис. 1. *Rh. trifolii* из культуры на разных средах с сахарозой: а) агар, б) жидкая среда, в) почва.

Fig. 1. — *Rhizobium trifolii* from the various saccharose media: a — agar medium, b — fluid medium, c — soil medium.



Rys. 2. — *Rh. meliloti* w hodowli na różnych podłożach: a) w szczepionce agarowej z mannitem, b) w szczepionce agarowej z sacharozą, c) w szczepionce glebowej z mannitem.

Рис. 2. *Rh. meliloti* из культур на разных средах: а) агаровая среда с маннитом, б) агаровая среда с сахарозой, в) почва с маннитом.

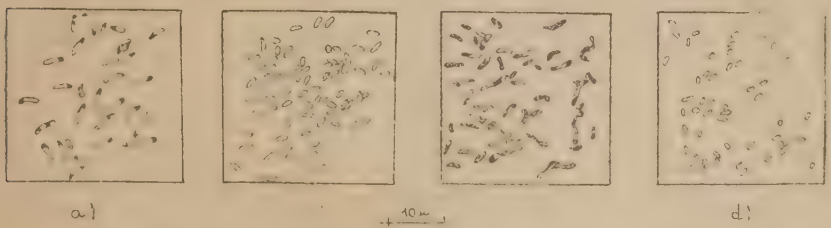
Fig. 2. — *Rh. meliloti* from various media: a — agar medium with mannitol, b — agar-saccharose medium, c — soil-mannitol medium.

dla normalnego rozwoju zgranulowanie plazmy występuje tylko na podłożach płynnym i agarowym z mannitem. Sacharoza działa na rozwój *Rh. japonicum* ujemnie. Na pożywce płynnej i agarowej z sacharozą komórki tych bakterii barwiły się słabo. Wewnątrz komórek

nie stwierdzono charakterystycznej granulacji. Wielkość komórek nie przekraczała 2—3 μ, podczas gdy na mannicie długość ich dochodziła często do 7 μ. Słaby rozwój komórek tych bakterii obserwowano także na wszystkich podłożach glebowych, niezależnie od tego, czy źródłem węgla był mannit, czy sacharoza (rys. 3).

Doświadczenie wazonowe z grochem. Do doświadczenia użyto grochu odmiany *Victoria*. Rośliny zakażono szczepionkami rozmnożonymi na trzech różnych podłożach z sacharozą jako ze źródłem węgla. Szczepionki stosowano w stanie świeżym bezpośrednio po ich przygotowaniu, a również po przechowaniu ich przez dwa miesiące w temperaturze pokojowej. Doświadczenie składało się z 6 kombinacji (tabl. II).

Rozwój roślin we wszystkich kombinacjach postępował dość równomiernie. Po trzech tygodniach wegetacji zauważono, że szczepionki płynne i glebowe lepiej oddziałują na roślinę, o ile użyto ich bezpośrednio po



Rys. 3. — *Rh. japonicum* w hodowli na różnych podłożach: a) w szczepionce agarowej z mannitem, b) w szczepionce agarowej z sacharozą, c) w szczepionce płynnej z mannitem, d) w szczepionce glebowej z mannitem.

Рис. 3. *Rh. japonicum* из культур на разных средах: а) агаровая среда с маннитом, б) агаровая среда с сахарозой, в) жидкая среда с маннитом, г) почва с маннитом.

Fig. 3. — *Rh. japonicum* from various media: a — agar-mannitol medium, b — agar-saccharose medium, c — fluid mannitol medium, d — soil mannitol medium.

przygotowaniu. Przy stosowaniu szczepionek starych wzrost roślin był nieco słabszy, a zieleń liści trochę mniej intensywna. W szczepionkach agarowych podobnych różnic nie zauważono. Po miesiącu wegetacji (na roślinach wyjętych z 2 wazonów) zauważono, że brodawki na roślinach zakażonych szczepionką płynną lub glebową występowały pojedynczo i były dość drobne (2—3 mm długości). Pod wpływem szczepionki agarowej wytworzyły się brodawki duże (średnio 4 mm długości), palczaste i w tonach, z mocno różowym zabarwieniem wnętrza.

Z pozostałych czterech wazonów zebrano rośliny po 6 tygodniach wegetacji; był to okres tworzenia strąków. Wskutek tego, że rośliny cho-

rowały (czarna nóżka) doświadczenie obarczone było dużym błędem doświadczalnym i różnice w plonie poszczególnych kombinacji okazały się nieistotne. Wyniki zestawione w tabl. II. Zaznaczamy, że w tym końcowym okresie wegetacji różnice w wyglądzie roślin i w ich brodawkowaniu nie były już tak wyraźne jak początkowo.

Doświadczenie wazonowe z lucerną. Rośliny w tym doświadczeniu zakażono świeżymi 10-dniowymi szczepionkami przygotowanymi na

Tablica II

Doświadczenie wazonowe z grochem
Wpływ zakażania roślin szczepionkami przygotowanymi na różnych podłożach i w różnym wieku

Влияние на растения инокуляции препаратами, приготовленными на разных средах
Опыт с горохом

The influence of the medium used for bacterial cultures and the duration of their storage on the yield of inoculated plants.
Pot-experiment with peas.

Podłoże szczepionki	Wiek szczepionki dni	Plon roślin po 6 tygodniach wegetacji g/wazon	
		powietrzno sucha masa korzeni	powietrzno sucha masa pędów
agarowe	8	1,55	7,11
	60	1,90	8,30
płynne	8	2,30	9,89
	60	1,61	8,40
glebowe	8	1,34	7,41
	60	1,50	6,20

Błąd doświadczalny dla pędów μ = 2,323 Półprzedział ufności przy P 0,95 = 4,027 g/wazon.

trzech różnych podłożach z mannitem lub sacharozą (tabl. III). Zależność aktywności szczepionek od fizycznych własności podłoża wystąpiła podobnie jak u grochu mało wyraźnie. Natomiast decydujący wpływ na ich aktywność wywarło źródło pożywienia węglowego.

Jak wynika z tabl. III, rośliny szczepione bakteriami hodowanymi na sacharozie dały plon kilkakrotnie niższy niż plon roślin szczepionych bakteriami wyhodowanymi na mannicie, przy czym rodzaj podłoża nie miał żadnego wpływu. Po 4 tygodniach wegetacji brodawki na korzeniach roślin, szczepionych bakteriami hodowanymi na mannicie były

różowe, natomiast na korzeniach roślin szczepionych bakteriami hodowanymi na sacharozie — białe. Dały się zauważyć jednak pewne różnice w wymiarze brodawek na roślinach zakażanych szczepionkami z mannitu zależnie od użytego podłoża. Najmniejsze brodawki tworzyły się na roślinach, które były szczepione szczepionką glebową. Długość ich wahała się w granicach 1—2 mm, podczas gdy na roślinach szczepionych szczepionką agarową wytworzyły się narośla znacznie większe (średnio 3 mm długie), o kształtach rozgałęzionych i intensywniej zabarwione na różowo. Różnice te przy zbiorze, tj. po 6 tygodniach wegetacji w okresie kwitnienia, nie były już widoczne.

Tablica III

I Doświadczenie wazonowe z lucerną

Wpływ zakażenia roślin szczepionkami przygotowanymi na różnych podłożach

Влияние на растения инокуляции бактериальным препаратом приготовленным на разных средах. Вазонный опыт с люцерной

The influence of the medium in bacterial cultures on the yield of inoculated plants. Pot-experiment with lucerne

Podłoże szczepionek	Źródło węgla w szczepionce	Plon roślin po 6 tygodniach wegetacji g/wazon	
		powietrzno sucha masa korzeni	powietrzno sucha masa pędów
agarowe	mannit	1,15	1,45
	sacharoza	0,35	0,47
płynne	mannit	1,19	1,92
	sacharoza	0,27	0,33
glebowe	mannit	0,90	1,22
	sacharoza	0,55	0,77

Błąd doświadczalny dla pędów μ = 0,52. Półprzedział ufności przy P = 0,95 — 0,9 g/wazon

Doświadczenie wazonowe z soją. Soja zakażana była szczepionkami przygotowanymi na podłożach: płynnym, agarowym i glebowym z mannitem. Szczepionki użyto w stanie świeżym po 20 dniach hodowli i po dwumiesięcznym przechowaniu. Dało to w sumie 6 kombinacji.

Rośliny wzeszły bardzo nierówno i do końca wegetacji zachowały się znaczne różnice w rozwoju i wzroście, wskutek czego nie zważono plonu roślin.

Ogólne obserwacje, które poczyniono na roślinach najbardziej typowych w poszczególnych kombinacjach, wykazały, że rośliny szczepione świeżymi szczepionkami — niezależnie od charakteru podłoża użytego do wyrobu szczepionek (płynna, agarowa, gleba), miały narośle zgrupowane głównie przy nasadzie korzenia głównego. Na roślinach zakażonych szczepionkami dwumiesięcznymi (płynnymi i na agarze) brodawki były rozrzucone po całym systemie korzeniowym. Różnic tych nie zauważono przy zastosowaniu szczepionek glebowych. Rośliny zakażone tymi szczepionkami tworzyły brodawki u nasady korzenia bez względu na wiek szczepionek.

II ROK DOŚWIADCZENIA

OPIS DOŚWIADCZENIA

W roku 1951 przygotowano szczepionki na następujących podłożach:

Pożywka płynna — na wyciągu fasolowym wg F i o d o r o w a, (1948). *

Pożywka agarowa — a) syntetyczna mineralna z mannitem i z wodą drożdżową, jak w roku 1949; b) na wyciągu fasolowym, podobnie jak szczepionka płynna.

Gleba — a) gleba piaszczysta, jak w roku 1949; b) gleba kompostowa. Wymienione podłoża zakażano szczepami *Rh. meliloti* (szczep Th) i *Rh. trifolii* (szczep nr 4), w sposób podany przy doświadczeniu z 1949 r.

Do doświadczeń wazonowych użyto nadto szczepionkę przyrządzoną z roztartych brodawek z roślin zakażonych tymi samymi szczepami, na których zostały przygotowane inne szczepionki. Brodawki te zdjęto z korzeni bezpośrednio przed ich użyciem do zakażenia roślin. Stosując wymienione szczepionki, założono doświadczenie wazonowe z koniczyną i z lucerną. Dla każdej rośliny było 6 kombinacji doświadczalnych (tabl. IV). Sposób założenia doświadczenia jak w roku 1949, z tą różnicą, że szczepionki dano w dużym nadmiarze, a nie jak poprzednio w stosunku do ilości szczepionki potrzebnej na 1 ha. Miało to na celu wyeliminowanie wpływu ilości komórek czynnych przy zakażaniu rośliny.

WYNIKI

Obserwacje mikroskopowe badanych szczepionek wykazały, że na wzrost komórek *Rh. meliloti* korzystnie wpływa wyciąg fasolowy. Komórki na tej pożywce były większe i lepiej się barwiły, niż na analogicznych podłożach z pożywką syntetyczną.

* Płynna szczepionka dla koniczyny i dla lucerny produkowano w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym na skalę techniczną w litrowych flaszkach na wyciągu fasolowym z sacharozą. Kontrola bakteriologiczna tych szczepionek wykazała, że *Rh. meliloti* rozwija się w tych warunkach zupełnie normalnie, natomiast *Rh. trifolii* tworzy formy zwyrodniałe. Prawdopodobnie gatunek ten jest wrażliwszy na ciśnienie tlenu i w wysokim słupie płynu odczuwa jego brak.

Szczepionka płynna dla *Rh. trifolii*, przygotowana na wyciągu fasolowym, uległa silnemu zakażeniu przez *Bac. mycoides* i przez ziarniak. Komórki *Rhizobium* odznaczały się nienaturalną granulacją plazmy i zniekształconymi postaciami.

W szczepionkach glebowych stwierdzono obfitszy wzrost bakterii w glebie kompostowej niż w glebie piaszczystej. Kształt i wielkość komórek były w obu przypadkach jednakowe.

Tablica IV

Doświadczenie wazonowe z koniczyną i z lucerną w 1951 r.
Wpływ szczepionek wytwarzanych na różnych podłożach na plon roślin

Влияние на растения инокуляции бактериальным препаратом выращенным на разных средах. Вазонный опыт с клевером и люцерной, 1951 г.

The influence of the medium used for bacterial cultures on the yield of inoculated plants. Pot-experiments, lucerne and clover, 1951

Rodzaj szczepionki	Koniczyna, plon powietrzno suchej masy z 2 pokosów		Lucerna, plon powietrzno suchej masy z 3 pokosów	
	korzenie g	pędy g	korzenie g	pędy g
1. agarowa syntetyczna z mannitem	6,12	21,51	13,53	18,18
2. agarowa z wyciągiem fasolowym i sacharozą	5,60	19,95	13,47	19,96
3. płynna z wyciągiem fasolowym i sacharozą	3,37	10,35	15,50	19,55
4. glebowa: na szczerku z sacharozą	6,25	23,20	12,00	20,17
5. glebowa: na glebie kompostowej z sacharozą	5,85	20,04	15,70	20,88
6. roztarte brodawki	6,29	22,10	15,47	22,01
Błąd doświadczalny dla pędów Półprzedział ufności przy P = 0,95		μ — 1,58 2,67 g na wazon		μ — 1,09 1,85 g na wazon

Aktywność tych szczepionek sprawdzono w doświadczeniu wazonowym z koniczyną i z lucerną.

Jak wynika z tabl. IV nie stwierdzono w tym doświadczeniu istotnych różnic w działaniu szczepionek z różnych podłoży na rośliny. Jedynie płynna szczepionka na wyciągu z fasoli użyta do hodowli bakterii

koniczyny, zakażona obcymi organizmami, spowodowała bardzo słaby rozwój roślin. Mogło to wyniknąć po prostu z osłabienia *Rhizobium* przez współżycie z innymi bakteriami w szczepionce.

OGÓLNE WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań można wyprowadzić następujące wnioski:

1. Wszystkie zastosowane przez nas podłoża, a więc: agarowe, płynne i glebowe, nadają się do wyrobu szczepionek dla roślin motylkowych. Różnice w stopniu aktywności różnych gatunków bakterii brodawkowych, hodowanych na tych podłożach, sprawdzano w doświadczeniach wegetacyjnych. Plony roślin szczepionych różnymi szczepionkami utrzymywały się na ogół w granicach błędu doświadczalnego.

2. Obliczenie ilości żywych komórek w szczepionkach wykazało, że bakterie mnożą się dobrze na wszystkich podłożach, o ile mają zapewniony swobodny dostęp tlenu i znajdują w podłożu odpowiednie pożywienie węglowe. Stosunkowo najmniej licznie rozwijają się bakterie na podłożach piaskowych.

3. Niezależnie od formy szczepionki znaczny wpływ na aktywność szczepionki dla lucerny wywierał rodzaj pożywienia węglowego. Zagadnieniem tym zajmiemy się w odrębnej publikacji.

Uwzględniając wyniki naszych badań oraz biorąc pod uwagę względy techniczne przy produkcji i użytkowaniu szczepionek oraz względy ekonomiczne, należy podkreślić następujące dobre i złe strony poszczególnych podłoży:

Podłoże	Zalety	Wady
Płynne	1. Łatwość wyjaławiania podłoża i przygotowania szczepionek 2. Łatwość kontroli bakteriologicznej	1. Złe warunki tlenowe, konieczność specjalnych urządzeń nawietrzających 2. Szybki i często niekorzystny metabolizm *Rhizobium* 3. Łatwe opanowywanie środowiska przez przypadkowe zakażenia 4. Trudność transportu 5. Sztuczne warunki środowiska

c. d.

Podłoże	Zalety	Wady
Agarowe	1. Łatwość wyjaławiania podłoża i przygotowania szczepionek 2. Dobre warunki tlenowe 3. Łatwość kontroli bakteriologicznej	1. Drogi, importowany surowiec 2. Sztuczne warunki środowiska
Glebowe	1. Warunki środowiska hodowlanego zbliżone do naturalnych 2 Neutralizujący wpływ gleby na produkty metabolizmu bakteryjnego 3. Tani surowiec 4. Łatwość transportu	1. Trudność wyjaławiania podłoża 2. Trudność kontroli bakteriologicznej 3. Zmienny fizyczny i chemiczny skład gleby i trudność jej doboru

Я. Голембиовска и Т. Врубель

ПРИГОДНОСТЬ РАЗНЫХ СРЕД ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ПРЕПАРАТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИНОКУЛЯЦИИ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

Резюме

Целью настоящей работы является определение пригодности разных сред для заготовки бактериальных препаратов для бобовых растений. В качестве среды для бактериальных препаратов использовано: 1. агаровую среду 2. жидкую среду, 3. почву, 4. торф и 5. песок. В полученных на этих средах культурах бактерий авторы сравнивали степень развития и жизнедеятельность клубеньковых бактерий.

Пригодность этих бактериальных препаратов была авторами проведена путем вегетационных экспериментов на соответственных бобовых растениях.

На основании проведенных опытов установлено, что все применяемые среды пригодны для заготовки бактериальных препаратов для бобовых растений. Урожай растений инокулированных препаратами приготовленными на различных средах был всегда почти одинаковый. На понижение активности препарата у люцерны оказывало значительное влияние только замещение маннита сахарозой.

J. Gołębiowska and T. Wróbel

THE USEFULNESS OF VARIOUS MEDIA FOR PRODUCTION OF ROOT NODULE BACTERIAL PREPARATIONS FOR INOCULATIONS OF LEGUMINOUS PLANTS

Summary

The usefulness of following media for production of bacterial preparations for inoculation of leguminous plants was examined: 1) agar medium, 2) fluid medium, 3) soil, 4) peat and 5) sand.

There were compared the viability and the intensity of growth of *Rhizobium* in all these media. The value of the preparations was determined in pot-trials with inoculated plants.

It was shown that all tested media are suitable for the production of bacterial preparations The yield of inoculated plants was very little influenced by the kind of used medium.

Only the bacterial preparation prepared for lucerne on saccharose media was less active than preparations made on mannitol media.

LITERATURA

1. Fiodorow M. W.: Biologiczeskaja fiksacja azota atmosfiery, Sielchozgiz, Moskwa 1948. 2. Izrailski W. P., 1933 — wg Rudakowa K. I: Nitragin, obzor za 1944 — 1950. Mikrobiołogia, 1951, 20:348. 3. Kühn, 1896 — wg Fiodorowa, 1948. 4. Nobbe F. i Hiltner L. — wg Freda E.B., Bałdwina I.L. i Mc Coy'a E.: Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants, University of Wisconsin Press, Madison 1932. 5. Potapow N. G., 1946 — wg Rudakowa, 1951. 6 Spinka J.: Szczepionki dla roślin strączkowych (prospekt w jęz. polskim o szczepionkach czeskich, 1950).

Acta Microbiologica Polonica, Vol. 1, No 4

J. Gołębiowska

WPŁYW ŻYWIENIA *RH. TRIFOLII* I *RH. MELILOTI* RÓŻNYMI ZWIĄZKAMI WĘGLA NA ICH AKTYWNOŚĆ W SYMBIOZIE Z ROŚLINĄ

Z Działu Mikrobiologii Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach.

Wpłynęło dnia 22.VIII.1952 r.

Bakterie brodawkowe mogą korzystać z wielu związków organicznych jako ze źródła energii i węgla. Przy tym różne ich gatunki mają swoiste wymagania pod względem charakteru substancji energetycznej. Zaobserwowano także, że na zdolność fermentowania i utleniania substratu przez poszczególne gatunki *Rhizobium* wpływa rodzaj związku azotowego podanego im w pożywce.

Badania nad odżywianiem się *Rhizobium* prowadzili między innymi Neal i Walker (1935). Z pomocą mikrorespiratora oznaczali oni intensywność oddychania *Rh. meliloti* i *Rh. japonicum* w zależności od obecności zredukowanej lub utlenionej postaci azotu mineralnego w pożywce. W szczególności *Rh. meliloti* zużywało energicznie arabinozę i galaktozę czerpiąc azot z soli amonowych, podczas gdy *Rh. japonicum* fermentowało najlepiej arabinozę w obecności azotanów.

Georgi i Ettinger (1941) prześledzili rozwój i zdolność fermentacyjną kilku gatunków *Rhizobium* hodowanych na różnych cukrach i solach kwasów organicznych. W badaniach ich prowadzonych również z pomocą mikrorespiratora, jedno- i dwucukry były na ogół łatwiej fermentowane przez *Rhizobium* niż wielocukry i sole kwasów organicznych. Nie znaleziono różnic w wykorzystywaniu związków węglowych przez aktywne i nieaktywne szczepy bakterii brodawkowych.

Badania prowadzone przez Burrisa, Phelpsa i Wilsona (1942) wykazały, że *Rhizobium* ma zdolność tworzenia enzymów adaptacyjnych. Tak na przykład *Rh. meliloti*, hodowane przez pewien czas na mannicie, sorbicie lub glicerynie, przystosowywało swój aparat enzymatyczny do coraz intensywniejszego fermentowania tych alkoholi. Nato

miast przy stałej hodowli tej bakterii na glukozie zdolność fermentowania tego cukru pozostała nie zmieniona.

Ogólnym celem przytoczonych badań było określenie zdolności fermentacyjnych różnych gatunków *Rhizobium* w hodowlach laboratoryjnych. Przypuszczano, że na tej podstawie uzyska się lepszy wgląd w biochemiczną naturę współżycia *Rhizobium* z różnymi roślinami. Dotychczasowe badania nie wykazały jednak, czy hodowla *Rhizobium* w sztucznych warunkach na różnych związkach węgla może mieć wpływ na późniejszą aktywność tych bakterii przy wiązaniu azotu w symbiozie z rośliną.

Zagadnienie to stało się przedmiotem naszych badań. Sprawdzając bowiem przydatność różnych podłoży do wyrobu szczepionek dla roślin motylkowych (Gołębiowska i Wróbel, 1952) zauważyliśmy, że zastosowanie sacharozy do hodowli *Rhizobium meliloti* bardzo obniżyło zdolność tych bakterii do wiązania azotu, a to spowodowało, że plon roślin szczepionych bakteriami hodowanymi na sacharozie był kilkakrotnie niższy niż plon roślin szczepionych bakteriami wyhodowanymi na mannicie.

BADANIA WŁASNE

Do badań użyto dwa szczepy *Rh. trifolii*, i jeden szczep *Rh. meliloti*. Hodowano je na różnych związkach trójpierwiastkowych, po czym sprawdzano w doświadczeniach wazonowych ich zdolność wiązania azotu przy współżyciu z odpowiadającymi im roślinami.

Doświadczenia wegetacyjne z koniczyną i lucerną prowadzono na wyprażonym, czystym piasku kwarcowym zasilonym wszystkimi potrzebnymi do wzrostu solami mineralnymi z wyjątkiem azotu. W czasie trwania wegetacji utrzymywano wilgotność piasku w granicach 40—50% całkowitej pojemności wodnej. Starano się zachować aseptyczne warunki hodowli roślin w celu uniknięcia przypadkowego zakażenia.

Doświadczenie z Rh. trifolii. Badania prowadzono z dwoma szczepami *Rh. trifolii* z kolekcji Działu Mikrobiologii I.U.N.G. w Puławach. Jeden z tych szczepów (nr 4) odznacza się dużą zdolnością asymilacyjną, podczas gdy drugi („F") asymiluje azot w słabym stopniu. Szczepy te przechowuje się w kolekcji Działu na syntetycznej pożywce agarowej z wodą drożdżową i mannitem.

Szczepionki dla doświadczeń przygotowano w 100 ml erlenmeyerkach zawierających po 30 ml bezazotowej płynnej pożywki mineralnej z wodą drożdżową i jednym z następujących źródeł energii i węgla w ilości 1%: glukoza, fruktoza, sacharoza, maltoza, gliceryna lub mannit. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28 °. Zmętnienie wystąpiło po 24 godzinach we wszystkich pożywkach, co świadczy o możliwości rozwoju *Rh. trifolii* na wszystkich wymienionych połączeniach węglowych.

Otrzymane w ten sposób 5-dniowe hodowle bakterii użyto do zaszczepienia koniczyny w doświadczeniu wegetacyjnym. Doświadczenie to założono w doniczkach o pojemności 1 kg piasku w 12 kombinacjach doświadczalnych (tabl. I). Jedną serię roślin zakażono szczepem nr 4, drugą — szczepem „F". Korzonki kilkudniowych roślin koniczyny białej (*Trifolium pratense*) przed wypikowaniem ich do

doniczek zanurzono w płynnych szczepionkach. Roślinki wysadzono dn. 19 czerwca 1950 r. w ilości po 10 sztuk na doniczkę, zakładając po 3 doniczki równoległe dla każdej kombinacji.

Rozwój roślin we wszystkich kombinacjach był powolny. Początek symbiozy w tym doświadczeniu był opóźniony, tak że rośliny przez dłuższy czas (3 tygodnie) cierpiały na głód azotowy. Aby je wzmocnić, dodano do każdej doniczki po 10 mg N w postaci azotanu amonowego. W tym też czasie na roślinkach pojawiły się mszyce, w obronie przed którymi wypendzlowano liście roztworem nikotyny. Po tych zabiegach wzrost roślin szybko się poprawił i już 7 lipca, to jest w czwartym tygodniu wegetacji, zaznaczyły się różnice we wzroście koniczyny w poszczególnych kombinacjach. Różnice te stały się wyraźniejsze po 6 tygodniach. Zaobserwowano wówczas, że koniczyna zaszczepiona hodowlą bakterii na glicerynie wyróżnia się specjalnie silnym wzrostem i intensywnym zabarwieniem. Dobry wzrost otrzymano również, gdy rośliny były szczepione bakteriami odżywianymi mannitem lub sacharozą. Specjalnie niekorzystnie na symbiotyczne własności *Rh. trifolii* oddziaływała ich hodowla na maltozie. Różnice te występowały w przypadku obu badanych szczepów. Po 7 tygodniach wegetacji rośliny zebrano. Plon ich świeżej masy podany jest w tabl. I.

Ze względu na małą masę roślin w poszczególnych doniczkach, w każdej serii ważono sumę plonów wszystkich roślin.

Tablica I

Wpływ żywienia *Rh. trifolii* różnymi związkami węgla na ich energię symbiotycznego wiązania azotu

Doświadczenie wegetacyjne z koniczyną białą, rok 1950.

Влияние питания *Rh. trifolii* разными соединениями углерода на их симбиотическую активность. Вегетационный опыт с белым клевером, 1950 г.

The effect of various carbon sources on the subsequent nitrogen fixing activity of *Rh. trifolii* in symbiosis with the clover. Pot-experiment, 1950

Połączenie węglowe	Szczep nr 4			Szczep „F"		
	ilość roślin	plon świeżej masy pędów		ilość roślin	plon świeżej masy pędów	
		g	%		g	%
1) mannit	28	10.6	100	29	9,8	100
2) gliceryna	27	17,9	169	26	15,0	153
3) glukoza	25	8,5	80	29	8,2	83
4) fruktoza	24	10,1	95	24	5 4	55
5) sacharoza	29	14 4	135	29	9,1	92
6) maltoza	24	5,8	54	22	4.9	50

Jak wykazuje tabl. I, najlepszy plon dały rośliny szczepione bakteriami z pożywką z gliceryną.

Brodawkowanie roślin. Nie zauważono wyraźniejszych różnic w typie brodawkowania. Brodawki przeważnie pojedyncze, drobne, owalne, zdrowe, o barwie białej z różowym odcieniem, były zawsze rozmieszczone równomiernie na korzeniu głównym i na korzeniach bocznych. Znaleziono jednak pewną różnorodność w wyglądzie samych bakteroidów w preparatach mikroskopowych. Preparaty sporządzano z narośli zdrowych, wielkości 1 — 2 mm i jednakowo zabarwionych, mniej więcej z tych samych części korzeni. Preparaty barwiono fuksyną fenolową.

We wszystkich kombinacjach wygląd mikroskopowy bakteroidów w narośla nie zależał od rodzaju użytego szczepu *Rh. trifolii*. Natomiast wpływ źródła węgla, na którym wyhodowano szczepionki, zaznaczył się dość wyraźnie. W doświadczeniu tym wyróżniono następujące typy bakteroidów:

1. Komórki o określonym kształcie, fuksyną barwią się silnie i jednolicie (rys. 1). Charakterystyczne dla szczepionek z mannitu.

2. Komórki o określonym kształcie, plazma zgranulowana (rys. 2) Charakterystyczne dla szczepionek z maltozy.

3. Kształty komórek nieregularne. W obrazie mikroskopowym dużo pustych pęcherzy, nie barwiących się, i komórki w stanie rozkładu. Barwią się fuksyną niejednolicie, trafiają się komórki silnie — obok słabo zabarwionych. Obraz taki obserwowano w preparatach z brodawek utworzonych przez szczepy *Rhizobium* wyhodowane na fruktozie, glukozie, sacharozie i glicerynie (rys. 3).

Wpływ rodzaju pokarmu węglowego na budowę komórki *Rhizobium* zaznaczył się więc dość wyraźnie. W naszym doświadczeniu było to niezależne od stopnia aktywności szczepów. Jest rzeczą możliwą, że zmianom w budowie komórek towarzyszyły zmiany samego kompleksu enzymatycznego. Świadczyły o tym różnice w zdolności wiązania azotu przez *Rhizobium* zależnie od rodzaju pożywienia węglowego podanego im w hodowli laboratoryjnej (tabl. I).

Doświadczenie z Rh. meliloti. W pracy poświęconej wpływowi różnych podłoży na jakość szczepionek dla lucerny (Gołębiowska i Wróbel, 1952) stwierdziliśmy, że przy stosowaniu szczepionek przygotowanych na sacharozie rośliny dały plon kilkakrotnie niższy niż w przypadku użycia szczepionek na mannicie. W celu zbadania, czy *Rh. meliloti* może przystosować się do rozwoju na sacharozie, nie tracąc przy tym zdolności wiązania azotu, przeprowadzono następujące doświadczenie. W 1949 r. wyodrębniono 4 szczepy *Rh. meliloti* z narośli

Rys. 1. — Bakteroidy z narośli na korzeniach koniczyny, szczepionej *Rh. trifolii* wyhodowanym na mannicie

Rys. 2. — Bakteroidy z narośli na korzeniach koniczyny, szczepionej *Rh. trifolii* wyhodowanym na maltozie

Rys. 3. — Bakteroidy z narośli na korzeniach koniczyny, szczepionej *Rh. trifolii* wyhodowanym na fruktozie

Рис. 1. Бактероиды из клубеньков на корнях клевера, инокулированного *Rh trifolii* выращенным на среде с маннитом

Рис. 2. Бактероиды из клубеньков на корнях клевера, инокулированного *Rh. trifolii* выращенным на среде с мальтозой.

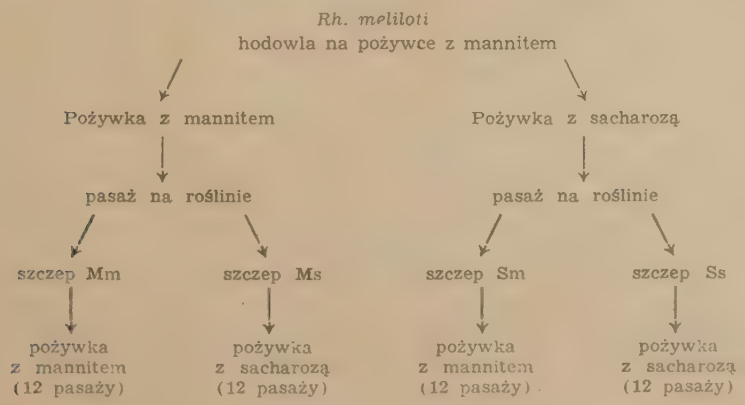
Рис. 3. Бактероиды из клубеньков на корнях клевера инокулированного *Rh. trifolii*, выращенным на среде с фруктозой.

Fig. 1. — Bacteroids from a nodule on a root of a clover, inoculated with *Rh. trifolii* cultivated on the mannitol medium

Fig. 2. — Bacteroids from a nodule on a root of a clover, inoculated with *Rh. trifolii* grown on the maltose medium

Fig. 3. — Bacteroids from a nodule on a root a clover, inoculated with *Rh. trifolii* grown on the fructose medium

na lucernie, zakażonej bakteriami wyhodowanymi bądź to na sacharozie, bądź też na mannicie (patrz opis doświadczenia wegetacyjnego. Gołębiowska i Wróbel. 1952). Izolowanie i następną hodowlę tych szczepów ilustruje następujący schemat.



Otrzymano w ten sposób 4 następujące szczepy:

1) „*Mm*", hodowany stale na mannicie, w 1949 r. pasażowany przez roślinę i wyosobniony ponownie na pożywce z mannitem.

2) „*Ms*", hodowany stale na mannicie, w 1949 r. pasażowany przez roślinę i wyosobniony na pożywce z sacharozą.

3) „*Sm*", hodowany stale na mannicie, w 1949 r., bezpośrednio przed pasażem przez roślinę, przeszczepiony na pożywkę z sacharozą, a następnie wyosobniony z rośliny na pożywce z mannitem.

4) „*Ss*", hodowany stale na mannicie, w 1949 r., bezpośrednio przed pasażem przez roślinę, przeszczepiony na pożywkę z sacharozą i wyosobniony z rośliny na pożywce z sacharozą.

Tak przygotowane szczepy przechowywano przez rok na podłożu agarowym, przeszczepiając je co miesiąc na świeżą pożywkę mineralną z wodą drożdżową i mannitem (szczep *Mm* i *Sm)* lub z sacharozą (szczep *Ms* i *Ss).*

Przy wyodrębnianiu tych szczepów z brodawek korzeniowych robiono preparaty mikroskopowe. Okazało się, że podobnie jak u *Rh. trifolii*, rodzaj pożywienia węglowego, na którym hodowano *Rh. meliloti*, wywierał wpływ na budowę bakteroidów w brodawkach korzeniowych. Bakteroidy w roślinach szczepionych szczepionką z mannitu („*M*") były smuklejsze i barwiły się fuksyną na intensywnie czerwony kolor, podczas gdy bakteroidy z roślin szczepionych *Rhizobium* z sacharozy („*S*") barwiły się bardzo słabo. Taki stosunek *Rh. meliloti* żywionego sacharozą do barwników anilinowych zaobserwowano również w preparatach z hodowli laboratoryjnych.

I doświadczenie wegetacyjne. Przeprowadzono je w 1950 r. w parafinowanych wazonach metalowych, wypełnionych 10 kg prażonego piasku z pełną pożywką mineralną z wyjątkiem azotu. W poszczególnych kombinacjach doświadczalnych rośliny przy pikowaniu ich do wazonów zakażano przygotowanymi jak wyżej szczepionkami. W szczególności założono 6 następujących kombinacji: 1) rośliny nieszczepione, kontrolne, 2) rośliny szczepione szczepem *Th* z kolekcji Działu, nie pasażowanym od 1940 r., oraz rośliny szczepione szczepami: 3) *Mm*, 4) *Ms*, 5) *Sm*, 6) *Ss*. W każdej kombinacji doświadczalnej było po 5 wazonów równoległych.

W czasie wegetacji w tym doświadczeniu nie zauważono większych różnic we wzroście roślin w poszczególnych kombinacjach. Rośliny zebrano w okresie kwitnienia. Plony zestawione są w tabl. II.

Tablica II

Wpływ sacharozy na symbiotyczną aktywność wiązania azotu *Rh. meliloti* w doświadczeniu wazonowym z lucerną. Rok 1950.

Влияние сахарозы на симбиотическую активность *Rh. meliloti*. Вазонный опыт с люцерной, 1950 г.

The effect of saccharose on the nitrogen fixing activity of *Rh. meliloti* in symbiosis with lucerne. Pot-experiment, 1950.

Szczep *Rh. meliloti*	Plon powietrzno suchy w g na wazon	
	korzenie	nadziemne części
1. kontrola nieszczepiona	1,8	1,3
2. *Th*	9,6	8,1
3. *Mm*	8,6	8,3
4. *Ms*	7,3	6,4
5. *Sm*	8,4	7,9
6. *Ss*	8,1	7,6

Błąd doświadczalny dla pędów: μ = 0,6 Półprzedział ufności przy P = 0.95 — 1.08 g wazon.

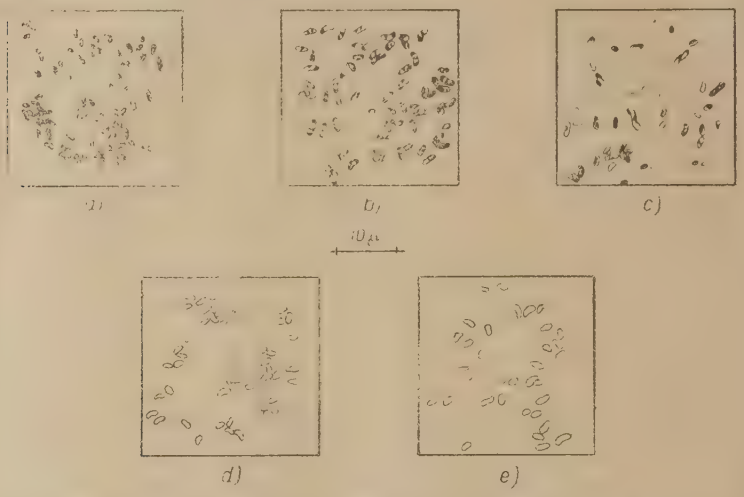
Z danych tych wynika, że różnica w plonie, którą można by było uznać za istotną, zaznaczyła się tylko w tym przypadku, gdy użyto szczepionkę przygotowaną ze szczepu przeniesionego z mannitu na sacharozę (*Ms*) bezpośrednio przed zaszczepieniem nim rośliny. Szczep *Ss*, wyosobniony na pożywce z sacharozą i hodowany na tym związku przez rok w symbiozie z rośliną, był aktywniejszy od szczepu *Ms*. Dowodziłoby to, że istnieje możliwość przystosowania się *Rh. meliloti* do odżywiania się sacharozą. Inne szczepy nie różniły się między sobą pod względem oddziaływania na plon roślin.

II doświadczenie wegetacyjne. W 1951 r. przeprowadzono drugie doświadczenie wazonowe z lucerną szczepioną *Rh. meliloti*, hodowanym na różnych związkach trójpierwiastkowych. Podłoże dla roślin i inne warunki doświadczenia zachowano takie same jak w 1950 r.

Przygotowanie szczepionek. Na syntetyczną pożywkę agarową z wodą drożdżową z dodatkiem mannitu, glukozy, gliceryny lub sacharozy wysiano szczep *Th* z kolekcji Działu, oraz na pożywkę z sacharozą szczep *Ss* z poprzedniego doświadczenia.

Po siedmiu dniach hodowli w temp. 28 zauważono znaczne różnice we wzroście bakterii na różnych związkach węglowych. Najobfitszy i najgęstszy wzrost tworzył się na glicerynie. Rysa była gładka, biała, matowa. Na mannicie wzrost był równie obfity ale bardziej przezroczysty. Podobny charakter wzrostu znaleziono na glukozie. Na sacharozie oba szczepy, to jest szczep *Th* i szczep *Ss*, dały wzrost najsłabszy i najbardziej prze-

zroczysty. Wygląd mikroskopowy tych hodowli przedstawiony jest na rys. 4. Z siedmiodniowego wzrostu na agarze przygotowano zawiesinę bakterii w wyjałowionej wodzie i użyto po 1 ml tak sporządzonej szczepionki do zakażenia 20 roślin lucerny wypikowanych do jednego wazonu. W 1 ml szczepionki według obliczenia w komorze Thoma znajdowało się około 50 milionów komórek.



Rys. 4. — *Rh. meliloti* z hodowli na różnych związkach węgla: a) szczep *Th* na mannicie, b) szczep *Th* na glicerynie, c) szczep *Th* na glukozie, d) szczep *Th* na sacharozie, e) szczep *Ss* na sacharozie

Рис. 4. *Rh. meliloti* из культур на различных соединениях углерода: а) штамм *Th.* на среде с маннитом, б) шт. *Th.* на среде с глицерином, в) шт. *Th.* на среде с глюкозой, г) шт. *Th.* на среде с сахарозой, д) шт. *Ss* на среде с сахарозой.

Fig. 4. — *Rh. meliloti* grown on the various sources of carbon: a — Strain *Th* on the mannitol medium, b — the same strain on the glicerol medium, c — the same on the glucose medium, d — the same on the saccharose medium, e — strain *Ss* on the saccharose medium.

Mniej więcej po miesiącu wegetacji zaznaczył się na roślinach szczepionych korzystny wpływ asymilacji azotu. W tym też mniej więcej czasie zaobserwowano różnice we wzroście w poszczególnych seriach. Najsilniej asymilowały azot rośliny zakażone szczepionkami z mannitu i z glukozy. Pośredni wzrost miały rośliny szczepione szczepem *Ss*, wyhodowanym na sacharozie. Najsłabiej rozwijały się rośliny w serii szczepionej szczepem *Th*, przeniesionym z mannitu na sacharozę bezpośrednio przed użyciem do doświadczenia wegetacyjnego. Załączona fot. 1 przed-

stawia rośliny w wieku 8 tygodni. Różnice te utrzymywały się potem jeszcze w ciągu miesiąca. Następnie, przed kwitnieniem, wskutek niewyjaśnionej przyczyny, rośliny zaczęły usychać. Podejrzewano, że brak im jest pożywienia w podłożu, jednakże dodatek pełnej pożywki mineralnej z wyjątkiem azotu nie poprawił ich rozwoju. Wobec tego nie podajemy ostatecznych wyników tego doświadczenia.

Fot. 1. — Wpływ różnych źródeł węgla na aktywność szczepionek dla lucerny. Doświadczenie wazonowe w 1951 r. Okres wzrostu 18.IV—21.VI.

Nr 200 — rośliny nieszczepione
Nr 207 — rośliny zakażone szczepem *Th* wyhodowanym na mannicie
Nr 214 — rośliny zakażone szczepem *Th* wyhodowanym na glicerynie
Nr 222 — rośliny zakażone szczepem *Th* wyhodowanym na glukozie
Nr 227 — rośliny zakażone szczepem *Th* wyhodowanym na sacharozie
Nr 235 — rośliny zakażone szczepem *Ss* wyhodowanym na sacharozie

Фот. 1. Влияние разных источников углерода на активность бактериальных препаратов для инокуляции люцерны. Вазонный опыт (1951 г.)

Период роста с 18.IV По 21.VI.
№ 200—неинокулированные растения
№ 207—растения инокулированные шт. *Th*. выращенным на среде с маннитом
№ 214—растения инокулированные шт. *Th* выращенным на среде с глицерином
№ 222—растения инокулированные шт. *Th*. выращенным на среде с глюкозой
№ 227—растения инокулированные шт. *Th*, выращенным на среде с сахарозой
№ 235—растения инокулированные шт. *Ss*. выращенным на среде с сахарозой

Phot. 1. — The effect of various carbon sources on the subsequent nitrogen fixing activity of root nodule bacteria in symbiosis with lucerne. Pot experiment 18.4 — 21.6.1951.

Nr 200 — uninoculated plants (control)
Nr 207 — plants inoculated with *Th* strain from mannitol medium
Nr 214 — plants inoculated with *Th* strain from glicerol medium
Nr 222 — plants inoculated with *Th* strain from glucose medium
Nr 227 — plants inoculated with *Th* strain from saccharose medium.
Nr 235 — plants inoculated with *Ss* strain from saccharose medium

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu rodzaju dodanego do podłoża źródła węgla na zdolność *Rhizobium* do wiązania azotu w symbiozie z rośliną. Przeprowadzono doświadczenie wegetacyjne z dwoma szczepami *Rh. trifolii* o różnej aktywności, oraz z jednym szczepem

Rh. meliloti, wyosobnionym bezpośrednio z rośliny albo na pożywce z mannitem, albo też na pożywce z sacharozą.

Stwierdzono, że : 1) hodowla laboratoryjna *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* w zależności od rodzaju źródła węgla, oddziałuje w różny sposób na cechy morfologiczne komórek oraz na aktywność szczepionek w symbiozie z rośliną;

2) zdolność wiązania azotu zarówno aktywnego jak nieaktywnego szczepu *Rh. trifolii* zwiększała się po przeniesieniu z mannitu na glicerynę. Natomiast przy przeniesieniu hodowli z mannitu na maltozę zdolność ta ulegała wyraźnemu osłabieniu;

3) *Rh. meliloti*, izolowane z lucerny, reaguje ujemnie na przeniesienie go z mannitu na sacharozę. Wyrazem tego jest silne obniżenie plonu na skutek osłabienia zdolności wiązania azotu podczas współżycia tych bakterii z lucerną. Stwierdzono, że prócz mannitu dobrym źródłem węgla dla *Rh. meliloti* jest glukoza. Natomiast żywienie tej bakterii gliceryną wpływa na asymilację azotu tak samo niekorzystnie jak żywienie sacharozą;

4) szczep *Rh. meliloti*, wyosobniony z rośliny wprost na pożywce z sacharozą, był aktywniejszy niż ten, który izolowano na pożywce z mannitem, a na sacharozę przeniesiono dopiero przed użyciem do zakażenia rośliny.

Wyniki doświadczeń świadczą o tym, że rodzaj żywienia węglowego *Rhizobium* w hodowli laboratoryjnej wywołuje pewne zmiany w komórkach tych bakterii, wpływając zarazem na późniejszą ich zdolność wiązania azotu w symbiozie z rośliną.

Na ogół więc *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* reagowały odrębnie na różne związki węglowe. Natomiast dwa szczepy *Rh. trifolii*, o różnej aktywności, zachowywały się w ten sam sposób względem różnych źródeł węgla

Specjalnie silnie zaznaczył się ujemny wpływ żywienia sacharozą na *Rh. meliloti*. Wydaje się jednak, że bakteria ta zdolna jest do przystosowania się do tego źródła węgla, zwłaszcza jeśli uprzednio nie hodowano jej na mannicie.

Я. Голембиовска

ВЛИЯНИЕ ПИТАНИЯ *RHIZOBIUM TRIFOLII* И *RH. MELILOTI* РАЗНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ УГЛЕРОДА НА ИХ АКТИВНОСТЬ В СИМБИОЗЕ С РАСТЕНИЯМИ

Резюме

Целью настоящей работы является изучение зависимости между способностью связывания молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиозе с растением, и родом источника снабжающего бактерий углеродом в предыдущем периоде. Авто-

ром проведены вегетационные опыты с двумя штаммами *Rh. trifolii* с разной активностью и с одним штаммом *Rh. meliloti*.

Полученные результаты указывают, что род углеродного питания, применяемого в лабораторных культурах *Rh. trifolii* и *Rh. meliloti*, вызывает не совсем определенные изменения в клетках упомянутых бактерий и влияет на дальнейшую их активность в связывании азота в симбиозе с растением. *Rh. trifolii* и *Rh. meliloti* реагировали своеобразно на разные углеродные соединения. Штаммы же *Rh. trifolii* с различной активностью вели себя одинаково по отношению к разным источникам углерода.

J. Gołębiowska

THE EFFECT OF THE CARBON SOURCE IN THE CULTURES OF *RH. TRIFOLII* AND *RH. MELILOTI* UPON THE NITROGEN FIXATION IN THE INOCULATED PLANTS

Summary

With the aim to determine the effect of various sources of carbon upon the nitrogen fixation by *Rhizobium*, the field and pot-experiments with inoculated leguminous plants were carried.

The experimental plants were inoculated with two strains of *Rh. trifolii* of different nitrogen fixing ability and with one strain of *Rh. meliloti*.

It was shown that the morphology and the structure of bacterial cell were influenced by the kind of carbon source (Fig. 1, 2, 3).

The amount of nitrogen fixation in symbiosis with plant depended also on the previous condition of carbon nutrition of root-nodule bacteria.

The reaction to various kinds of carbon source was specific, different in two tested species of *Rhizobium*. There was no difference in the reaction between two strains of *Rh. trifolii*.

LITERATURA

1. Burris R. H., Phelps A. S. i Wilson J. B.: Adaptations of *Rhizobium* and *Azotobacter*. Proc. Soil. Sci. Soc. Am., 1942, 7:272. 2. Georgi C. E. i Ettinger J. M.: wg Burrisa R. H. i Wilsona P. W.: Biological Nitrogen Fixation. Annual Review of Biochem., 1945, 14:685. 3. Gołębiowska J. i Wróbel T.: Przydatność różnych podłoży do produkcji szczepionek dla roślin motylkowych. Acta Microbiologica Polonica, 1952, 1:313. 4. Neal O. i Walker R.: Physiological 30:173.

Acta Microbiologica Polonica, Vol. 1, No 4

A. Szember

KISZONKI ZIEMNIACZANE I ICH MIKROFLORA

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej UMCS w Lublinie

Wpłynęło dn. 9.IX.1952 r.

Zagadnienie racjonalnego zakiszania ziemniaków, a w związku z tym poznanie działalności mikroorganizmów kwaszących i przemian biochemicznych zachodzących podczas kiszenia, nie zostało dotychczas wyczerpująco opracowane (Szember, 1952). W związku z tym autor postanowił przeprowadzić badania nad rozwojem mikroflory w ziemniakach podczas zakiszania, sporządzając kiszonki z tych płodów z dodatkiem roślin białkowych. Najogólniejszym celem pracy było znalezienie, jaką ilość tych roślin należy dodać do ziemniaków, by otrzymać kiszonkę smaczną i bogatą w składniki odżywcze.

OPIS UŻYTEGO MATERIAŁU I METOD BADAŃ

Do doświadczeń użyto głównie ziemniaków odmiany „Dar". Jest to odmiana o żółtym miąższu, o średniej skrobiowości, rakoodporna, bardzo plenna i późna.

Próby zakwaszania przeprowadzono w skali laboratoryjnej. Przed nastawieniem doświadczenia ziemniaki parowano w autoklawie w temp. 100° aż do zupełnego ich zmięknięcia, co trwało około 1 godz. W celu zaszczepienia wyjałowionych ziemniaków naturalnymi zespołami mikroflory i dla wzbogacenia zarazem ich składu odżywczego, dodawano do nich koniczyny świeżej lub wysuszonej, lub też dla celów porównawczych — kwaśnego mleka. Użyto koniczyny czerwonej, zbieranej w początkach stadium kwitnienia (pokosy z 8.VI.50, 1.X.50, 1.X.51 i 22.IV.52). Świeża masa koniczyny zawiera w tym okresie, wg Kellnera (1906), średnio 3,4% białka surowego. Zbioru jej dokonywano po upływie co najmniej trzech dni dobrej pogody, by do doświadczeń uzyskać materiał roślinny wraz z całą, nie zmytą przez deszcze, mikroflorą. Koniczynę cięto na sieczkę 1—2 cm długości.

Kwaśne mleko przeznaczone do naszych kiszonek było odtłuszczane i pozostawiane do zakwaszenia w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Do doświadczeń użyto mleka dającego skrzep o prawidłowej strukturze. Mleko zawiera wg Pijanowskiego (1948), przeciętnie 3,1% białka.

Założono też kombinację doświadczalną, w której mieszankę parowanych ziemniaków z koniczyną zakwaszano od razu do pH około 4.0 według chemicznej metody „A.I.V." (Virtanen, 1947). Użyto do tego mieszaniny 2n HCl + 2n H_2SO_4

chemicznie czystych. Ponieważ wartość tej metody wciąż jeszcze podlega dyskusji, celem naszym było porównanie rozwoju mikroflory w kiszonkach przyrządzonych na drodze chemicznej, z rozwojem mikroflory w produktach ukwaszonych wyłącznie przez czynnik biologiczny.

Wszystkie kombinacje doświadczalne sporządzano w 4 powtórzeniach. Ziemniaki przygotowywano do zakiszenia zawsze w sposób następujący: po uparowaniu, gorące ziemniaki rozgniatano wyjałowionym drewnianym wałkiem, a następnie dokładnie ubijano w jałowych słojach szklanych o pojemności 2 l. Gdy przyrządzano ich mieszankę z koniczyną, uparowane ziemniaki studzono do temperatury około 40 °, po czym mieszano możliwie dokładnie z sieczką koniczyny w oznaczonym stosunku wagowym. Użycie różnych dawek koniczyny miało na celu znalezienie takiego stosunku dodawanej koniczyny do ziemniaków, przy którym kiszonka byłaby dostatecznie wzbogacona w białko i równocześnie prawidłowo ukwaszona. Mieszankę ze zsiadłym mlekiem przyrządzano podobnie jak z koniczyną, wlewając 15% kwaśnego mleka do podstudzonych ziemniaków.

Kombinacje „A.I.V" sporządzono tak samo jak poprzednie, dodając wskazaną ilość kwasów mineralnych i dokładnie mieszając.

Po ubiciu w „Weckach" poszczególnych kombinacji paszowych, zalewano powierzchnię paszy 2 cm warstwą parafiny, w celu odcięcia dostępu powietrza.

Dla przekonania się przy jakiej ilości dodatków otrzyma się najlepszą kiszonkę ziemniaczaną, przeprowadzono w sumie 7 doświadczeń kiszonkowych. Opis poszczególnych kombinacji doświadczalnych podany jest w tabl. I—VI.

Czas trwania poszczególnych doświadczeń był następujący:

1. Od 13.III.50 do 31.III.50 r.
2. „ 8.VI.50 „ 29.VI.50 „
3. „ 1. X.50 „ 11. X.50 „
4. „ 26. II.51 „ 9.IV.51 „
5. „ 18. X.51 „ 8.XI.51 „
6. „ 20. X.51 „ 30. X.51 „
7. „ 22.IV.52 „ 3.VI.52 „

Po założeniu kiszonek przechowywano je w temperaturze 16—18°, w ciągu 7—42 dni, w zależności od rodzaju doświadczenia. Odczyn i stan mikroflory kiszonek badano w doświadczeniu 1 po upływie 0, 3, 18 dni; w 2 — 0, 3, 10, 21; w 3 — 0, 3, 7; w 4 — 0, 3, 7, 21, 42; w 5 — 0, 1, 2, 4, 6, 8, 21; w 6 — 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; w 7 — 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 42 dni fermentacji.

Wartość pH określano przy pomocy papierków indykatorowych „Lyphan" lub potencjometrycznie z pomocą elektrody chinhydronowej. Kwasotę ogólną oznaczano miareczkując próbki kiszonek 0,1 n NaOH wobec fenoloftaleiny i przeliczano na procent kwasu mlekowego w świeżej masie kiszonki. W doświadczeniu nr 3 i nr 4 określano stosunek ilości kwasu mlekowego do octowego i do masłowego przy pomocy metody Leppera (1938). (W doświadczeniu nr 3 określano ilości kwasów organicznych w kiszonce po 21-miesięcznym przechowywaniu).

Do badań brano próbki w sposób następujący: po usunięciu parafiny i wierzchniej warstwy produktu, pobierano ze środka każdego słoja po ok. 100 g świeżej masy kiszonki. Z próbki tej po wymieszaniu odważano po 1 g świeżej masy. Tę ilość kiszonki wytrząsano przez 20 minut ze 100 ml jałowej wody, po czym robiono dalsze rozcieńczenia. Każdą kombinację kiszonkową badano w 4 równoległych słojach, z każdego słoja oddzielnie.

Badania mikrobiologiczne obejmowały: 1. oznaczenie ilości bakterii fermentacji mlekowej, 2. oznaczenie ilości bakterii zakwaszających, 3. oznaczenie ilości bakterii

termofilnych, 4. oznaczenie ilości bakterii proteolitycznych, 5. oznaczenie ilości bakterii z grupy *coli - aerogenes*, 6. oznaczenie ilości bakterii gazujących, 7. oznaczenie ilości drożdży.

Jakościowo badano tylko bakterie kwaszące.

Do badań bakterii fermentacji mlekowej, bakterii niekwaszących i termofilów użyto tej samej pożywki agarowej, o składzie podanym przez Gaitnera (1926, z dodatkiem 1% laktozy, 1% glukozy, 0,5% peptonu i 200 ml wody drożdżowej na 1.000 ml wody wodociągowej. Dodano również 1% purpury bromokrezolowej przyrządzonej wg Tannera (1947).

Przy badaniu liczebności najczęściej używane rozcieńczenia dla bakterii fermentacji mlekowej i dla bakterii niekwaszących były następujące: 1:100.000, 1:1.000.000, 1:10.000.000 i 1:100.000.000. Dla bakterii termofilnych: 1:1.000 i 1:10.000. Zaszczepione płytki z pożywką dla bakterii kwaszących (fermentacji mlekowej) i bakterii niekwaszących, trzymano w temp. 28° przez 48 godzin. Płytki Petriego z pożywką dla termofilów umieszczono w temp. 50° na okres 24 godzin. Kolonie bakterii kwaszących odróżniano na płytkach od kolonii niekwaszących przy pomocy powyższego indykatora (o zasięgu pH 5,4—7,0).

Dla bakterii z grupy *coli* — *aerogenes* użyto pożywki Holta, Harrisa i Teaguego w modyfikacji Levinego (Prescott, Winslow, McCrady i Mac Harvey, 1949). Dla obliczenia tej grupy bakterii użyto następujące rozcieńczenia: 1:100 i 1:1000. Zaszczepione płytki wstawiano do temp. 37° na przeciąg 24 godzin. Na pożywce tej rozpoznawano kolonie bakterii z grupy *coli* — *aerogenes* po zielonkawo-złocistym połysku.

Drożdże badano na brzeczce 10° Ball. z agarem (Fred i Waksman, 1928). Hodowano je w temp. 28—30° przez 36 godzin. Rozcieńczenia używano następujące: 1:100, 1:1.000 i 1:10.000.

Bakterie proteolityczne wysiewano na bulion z żelatyną (Fred i Waksman 1928) i trzymano w temp. 18—20° przez 36 godzin. Rozcieńczenia: 1:1.000 i 1:10.000.

Bakterie gazujące badano w probówkach o wysokim słupie pożywki agarowej z glukozą, którego powierzchnię zalewano płynną parafiną. Rozcieńczenia używano następujące: 1:100, 1:1.000 i 1:10.000.

Wyosobnianie i oczyszczanie szczepów, sporządzanie preparatów i badania mikroskopowe oparto na zaleceniach Clausa (1941) oraz Tannera (1947).

Badając próbki kiszonek z poszczególnych słojów i przynajmniej w dwóch rozcieńczeniach, poświęcono w sumie dla każdej kombinacji po 48 płytek dla każdej z grup drobnoustrojów. W tablicach podano wyniki średnie.

Celem dokładniejszego zbadania jakości bakterii fermentacji mlekowej rozwijających się podczas zakiszania, wyosobniano ich szczepy w czasie trwania doświadczeń. Oczyszczano je, przesiewając wielokrotnie na płytkach Petriego z pożywką dla bakterii fermentacji mlekowej. Po uzyskaniu czystych hodowli, przystąpiono do określenia ich przy pomocy kluczów Bergeya (1948) i Krasilnikowa (1949). Do prób diagnostycznych brano hodowle młode (24-godzinne), po uprzednim ich odżywieniu przez trzykrotne przeszczepianie co 24 godziny na świeżą pożywkę.

Do określania rodzajów lub gatunków bakterii kwaszących rozwijających się w kiszonkach stosowano następujące próby i podłoża:

1. Określanie zdolności fermentowania poszczególnych cukrów diagnostycznych i alkoholi: sacharozy, maltozy, laktozy, rafinozy, arabinozy, skrobi, mannitu i gliceryny.

Używano pożywek płynnych z dodatkiem 1% badanego węglowodanu oraz indykatora. Nasilenie fermentacji obserwowano po 24 i po 48 godzinach. Hodowle prowadzono w temp. 28°.

2. Określanie tolerancji wobec 2%, 4%, 6,5%, 7,5% NaCl w pożywce płynnej z indykatorem. 7,5% dodatek soli kuchennej zastosowano w myśl wskazówek Pedersona i Albury'ego (1950).

3. Próba na reduktazę: użyto pożywkę płynną w wysokich probówkach z dodatkiem 0,01%, 0,1% i 0,3% błękitu metylenowego.

4. Peptonizacja i zakwaszanie mleka w temp. 28—30°. Zmiany obserwowano po 24 i po 48 godzinach (Fred).

5. Rozpuszczanie żelatyny słupkowej w temp. 18—20°. Obserwowano wzrost kolonii wzdłuż całego nakłucia.

6. Wzrost na ziemniaku.

7. Wzrost badanych szczepów na pożywce płynnej z indykatorem w następujących temperaturach: 35°, 40°, 45°, 50°.

W celu oznaczenia temperatury krytycznej dla poszczególnych szczepów, hodowano je wielokrotnie w powyższych temperaturach, sprawdzając następnie żywotność hodowli. Równocześnie z prowadzeniem hodowli badanych szczepów w wyższych temperaturach, trzymano, jako kontrolę, te same szczepy w temp. 28°. Do prób użyto pożywki płynnej dla bakterii mlekowych o składzie podanym uprzednio. W większości pożywek stosowano dodatek 1% purpury bromokrezolowej, przy pomocy której określano zdolność kwaszącą badanej hodowli. Wszystkie próby diagnostyczne prowadzono w dwóch równoległych powtórzeniach.

WYNIKI BADAŃ

W sumie przeprowadzono 7 doświadczeń laboratoryjnych nad kiszonkami ziemniaczanymi. Wyniki zebrano w tablicach I — VIII i na wykresie 1.

Doświadczenie nr 1 przeprowadzono orientacyjnie, by znaleźć jakich ilości mikroorganizmów kwaszących można się spodziewać podczas fermentacji kiszonki. Wyniki tego doświadczenia zebrano w tabl. I.

Widzimy, że zsiadłe mleko było silniejszą szczepionką bakterii kwaszących niż siano koniczyny (por. ilości bakterii w dniu zaszczepienia). Już jednak po 3 dniach zakwaszania bakterie te rozmnożyły sie najlepiej w kombinacjach zaszczepionych koniczyną (komb. II i IV), wskazując na dobre dla nich warunki w tym środowisku. Mikroflora zsiadłego mleka rozmnożyła się również, ale znacznie słabiej (komb. V). Kwasy mineralne, dając od razu pH 3,9, obniżyły nasilenie rozwoju mikroflory kwaszącej.

W doświadczeniu nr 2 (tabl. II) nie przygotowano kombinacji z kwaśnym mlekiem. Sporządzono natomiast dwa warianty z różnymi dawkami

Tablica I

Ilość bakterii kwaszących w tysiącach na 1,0 g świeżej masy kiszonek ziemniaczanych. Doświadczenie nr 1.

Количество кислотообразующих бактерий в тысячах на 1 г сырой массы картофельного силоса. Опыт 1.

The number of acidifieing bacteria (in thousands) per 1,0 g of silage. Experiment 1.

L.p.	Kombinacje	Ilość dni fermentacji					
		0	pH	3	pH	18	pH
I	Kontrola-same parowane ziemniaki	0	6,8	1.770	6,6	2.000	4,9
II	Parow. ziemniaki + 5% Koniczyny	2 300	6,1	217.000	5,8	2.000	4,0
III	„ „ + 10% „ + Kwasy mineral.	2.320	3.9	135 000	3,8	600	3.8
IV	„ „ + 10% Koniczyny + 15% Mleka zsiad.	10.400	5,8	251.900	5.5	100	3.9
V	„ „ + 15% „ „	12 000	5 8	98.000	5,6	60	4.1

koniczyny (komb. II i III). Celem było tu ustalenie najodpowiedniejszej dawki koniczyny, jako dodatku do parowanych ziemniaków.

W tabl. II widać we wszystkich kombinacjach ogromny wzrost ilości bakterii kwaszących po trzech dniach fermentacji. W wypadku ziemniaków z koniczyną (komb. II i III) ilość ich wynosi ponad 2 miliardy na 1 g świeżej masy kiszonki, co nie trwa jednak długo. Wyrazem działalności tych bakterii jest bardzo szybkie obniżenie się odczynu kiszonek. Widzimy wyraźnie, że szybkie zwiększanie się kwasowości kiszonek skutecznie hamuje rozwój bakterii proteolitycznych. Kwasy mineralne (komb. IV) hamują rozwój wszystkich bakterii, natomiast dobrze wpływają na rozwój drożdży.

Większa dawka koniczyny (komb. III) spowodowała szybki spadek pH na skutek energiczniejszej działalności mikroflory kwaszącej. Wzrost kwasoty kiszonki nie tylko zahamował rozwój bakterii proteolitycznych, ale po 21 dniach fermentacji ograniczył także rozwój bakterii kwaszących. W kiszonce tej zakończył się szybciej proces fermentacyjny. Jeszcze większa dawka koniczyny (komb. IV) nie wpłynęła dodatnio na rozwój mikroflory kwaszącej.

W doświadczeniu nr 3 sporządzono takie same kombinacje jak w doświadczeniu nr 2, z wyjątkiem drobnej zmiany w wysokości dawki koniczyny w kombinacjach III i IV. Dając jednakowe dawki koniczyny

Tablica II

Wpływ różnych dodatków do kiszonek ziemniaczanych na rozwój mikroflory. Doświadczenie nr 2. Ilości mikroorganizmów podane w tysiącach na 1.0 g świeżej masy kiszonki

Влияние разных прибавок к картофельным силосам на развитие в них микрофлоры. Опыт 2. Количество микроорганизмов в тысячах на 1 г сырой массы силоса

The effect of admixture to potato-silage of clover, mineral acids and skim milk on the number of microorganisms (in thousands) per 1.0 g of the silage

Kombinacje	Rodzaj drobnoustrojów	Ilość dni fermentacji							
		0	pH	3	pH	10	pH	21	pH
I	Bakterie kwaszące	0	6.4	293 000	5,9	404 000	4.8	59.000	4.2
II		37,5	5,8	2.340.000	4.3	451.000	4,2	23.600	4,2
III		63	5,8	2.510.000	4,3	670.000	4.1	15.000	4.1
IV		50	4,3	346.000	4,2	24.000	4,2	1.000	4.2
I	Bakterie niekwaszące	150		16.000		<10.000		<1.000	
II		406		<10.000		<10.000		1.000	
III		495		<10.000		<10.000		1.000	
IV		115		<10.000		<10.000		1.000	
I	Bakterie proteolityczne	8,8		1		0		0	
II		8,3		1		0		0	
III		70.0		62		0		0	
IV		55,0		0		0		0	
I	Drożdże	0		5.7		1		180	
II		73,5		53,9		324		445	
III		76,4		63,8		157		238	
IV		62,7		730		374		236	

Objaśnienia:

Kombinacje: I Kontrolna - parowane ziemniaki, II. Parowane ziemniaki — 10% koniczyny, III. Parowane ziemniaki + 17,5% koniczyny, IV. Parowane ziemniaki + 25% koniczyny + kwasy mineralne.

Объяснения:

I Контроль — запаренный картофель, II зап. картофель + 10% клевера, III зап. картофель + 17,5% клевера, IV — зап. картофель + 25% клевера + мин. кислоты.

Remark

I — steamed potatoes alone, II — steamed potatoes + 10% of clover, III — steamed potatoes + 17,5% of clover, IV — steamed potatoes + 25% of clover, + mineral acids.

w kombinacjach III i IV, można było teraz śledzić wpływ kwasów mineralnych na rozwój mikroflory. Wyniki tego doświadczenia zebrano w tabl. III.

Tablica III

Wpływ różnych dodatków do kiszonek ziemniaczanych na rozwój mikroflory
Doświadczenie nr 3. Ilość mikroorganizmów w tysiącach na 1.0 g świeżej masy kiszonki

Влияние разных прибавок к картофельным силосам на развитие в них микрофлоры
Опыт 3. Количество микроорганизмов в тысячах на 1 г сырой массы силоса
The number of microorganisms in potato-silage (in thousands per 1,0 g)

Kombinacje	Rodzaj drobnoustrojów	Ilość dni fermentacji					
		0	pH	3	pH	7	pH
I	Bakterie kwaszące	<1	6.1	800	5,8	392.000	5.4
II		1.600	5,8	653.000	4,3	420.000	4.3
III		1.590	5,8	1.570.000	4,3	480.000	4.1
IV		1.740	4.1	3.000	3,9	1.500	3.9
I	Bakterie niekwaszące	50		2.000		800	
II		525		45.000		<1.000	
III		700		2.000		<1.000	
IV		445		2.000			
I	Bakterie proteolityczne	10		<10		<1	
II		68		15		<1	
III		270		50		<1	
IV		90		<10		<1	
I	Bakterie z grupy *coli-aerogenes*	<0.1		<0,1		0,1	
II		0.9		5.3		0,1	
III		2,9		8		0.1	
IV		1,6		<0.1		0,1	
I	Termofile fermentujące cukry	<10		140		6,4	
II		8		630		8	
III		6		640		<1	
IV		5		9		<1	
I	Drożdże	<1		<1		44	
II		2,2		0.3		1	
IV		4,8		1		1.2	
III		3,3		6,5		103	

Objaśnienia:

Kombinacje: I. Kontrola — parowane ziemniaki, II. Parowane ziemniaki + 10% koniczyny, III Parowane ziemniaki + 20% koniczyny, IV. Parowane ziemniaki + 20% koniczyny + kwasy mineralne.

Объяснения:

I Контроль — запаренный картофель, II — зап. картофель + 10% клевера, III — зап. картофель + 20% клевера IV — зап. картофель + 20% клевера + мин. кислоты.

Remark

I — steamed potatoes alone, II — steamed potatoes + 10% of clover, III — steamed potatoes + 20% of clover, IV — steamed potatoes + 20% of clover + mineral acids.

W doświadczeniach nr 3 zmiany w ilościach bakterii kwaszących i obniżanie się odczynu przebiegają w ciągu 1 tygodnia w zasadzie podobnie jak w doświadczeniu nr 2. W doświadczeniu tym określono obok ilości bakterii kwaszących, niekwaszących i proteolitycznych, także ilości bakterii termofilnych fermentujących cukry oraz bakterii z grupy *coli-aerogenes*. Wzrost tych ostatnich, po początkowym dość silnym ich rozmnożeniu się, uległ całkowitemu zahamowaniu już po 3 dniach fermentacji (p. tabl. III). Także bakterie niekwaszące typu „*subtilis*", „*fluorescens*" i in., które stanowiły olbrzymią większość drobnoustrojów w chwili nastawienia kiszonki, całkowicie znikły po kilku dniach fermentacji.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynikałoby, że dawka 20% koniczyny pozwala uzyskać dobrą kiszonkę. Wskazuje na to prawidłowy przebieg procesu zakiszania, jak również dodatnie cechy organoleptyczne i trwałość produktu. Przeprowadzone po 21-miesięcznym przechowie kiszonek próby metodą Leppera na obecność w nich poszczególnych kwasów wykazały: kwasu mlekowego 2,75%, kwasu octowego 1,12%, kwasu masłowego 0,09%. Kiszonki uzyskane w doświadczeniu nr 3 oceniono przy pomocy klucza Fliega (Kołowca, 1951) dając im 31 punktów, a więc ocenę dobrą.

W doświadczeniu nr 4 oprócz kombinacji II (parowane ziemniaki z dodatkiem 20% koniczyny) użyto kombinacji zakwaszonej sztucznie według metody „A. I. V", jak również z dodatkiem 20% koniczyny (komb. III). Kombinacje te badano już w doświadczeniu nr 3. Teraz założono je ponownie w celu lepszego zbadania wpływu kwasów mineralnych na rozwój mikroflory. W doświadczeniu nr 4 wprowadzono również kombinację: ziemniaki parowane z dodatkiem kwaśnego mleka. Podobnie jak w doświadczeniu nr 1 nie dodano koniczyny świeżej, a wysuszonej. Wyniki tego doświadczenia zebrano w tabl. IV.

W doświadczeniu nr 4 możemy zaobserwować w kombinacji II dwa maksima wzrostu ilości bakterii fermentacji mlekowej. Pierwsze — po trzech dniach i drugie, znacznie niższe — po 21 dniach fermentacji. W kombinacji III, z kwasami mineralnymi, początkowe zahamowanie wzrostu bakterii kwaszących trwało do 21 dnia fermentacji. Od tego dnia aż do końca doświadczenia ilość bakterii wzrastała. Kombinacja IV, zakażona kwaśnym mlekiem, wykazuje od razu duże ilości bakterii kwaszących. Wahania ilości drobnoustrojów niekwaszących były w tym doświadczeniu podobne jak w doświadczeniach poprzednich. Ilość drożdży stale wzrastała podobnie jak w doświadczeniu nr 3, dochodząc po 6 tygodniach do kilku milionów na 1 g świeżej masy kiszonki (p. komb. II i III)

Tablica IV

Wpływ różnych dodatków do kiszonek ziemniaczanych na rozwój w nich mikroflory
Ilość mikroorganizmów w tysiącach na 1,0 g świeżej masy kiszonki

Doświadczenie nr 4.

Влияние разных прибавок к картофельным силосам на развитие в них микрофлоры.
Опыт 4. Количество микроорганизмов в тысячах на 1 г сырой массы силоса

The number of microorganisms in potato-silage (in thousands per 1,0 g)

Kombinacje	Rodzaj drobnoustrojów	Ilość dni fermentacji									
		0	pH	3	pH	7	pH	21	pH	42	pH
I	Bakterie kwaszące	1	6,2	47.800	6,2	364.000	5.8	626.000	4.8	197.000	4,1
II		15	6,2	991.000	4,0	424.000	4,2	584.000	4.1	67 000	4.1
III		15	4,1	5.200	3,9	100	3,9	2.500	4,0	7.000	4,0
IV		41.500	—	800.000	—	710.000	—	269 000	—	—	—
I	Bakterie niekwaszące	66		90		<1		<1		—	
II		293		237		<1		<1		—	
III		200		11		1		<1		—	
IV		—		—		—		—		—	
I	Drożdże	0,5		1		1		1,3		70	
II		0,5		1		31		960		2.500	
III		0,3		4,8		216		1,000		3.000	
IV		0,1		14		205		410		—	

Objaśnienia:

Kombinacje: I. Kontrola — parowane ziemniaki, II. Parowane ziemniaki + 20% koniczyny, III. Parowane ziemniaki + 20% koniczyny + kwasy mineralne, IV. Parowane ziemniaki + 15% zsiadłego mleka.

Обьяснения

I—Контроль—запаренный картофель, II—зап. картофель + 20% клевера. III—зап. картофель + 20% клевера + мин. кислоты, IV—зап. картофель + 20% клевера + 15% кислого молока.

Remark

I — steamed potatoes alone, II — steamed potatoes + 20% of clover, III — steamed potatoes + 20% of clover + min. acids, IV — steamed potatoes + 20% of clover + 15% of skim milk.

W doświadczeniu nr 4 oznaczano też ilość kwasów przez miareczkowanie ługiem sodowym. Stwierdzono po 42 dniach fermentacji następujące ilości kwasów wolnych w przeliczeniu na kwas mlekowy: kombinacja I — 2,3%, kombinacja II — 2,5%, kombinacja III — 1,3%.

Z przytoczonych wyników widać, że w kombinacji I i II powstaje około dwa razy więcej kwasów organicznych niż w komb. III. Dodatnie cechy organoleptyczne i prawidłowy rozwój mikroflory kwaszącej w tych kombinacjach, świadczą o ich wysokiej jakości.

W jesieni 1951 r., w celu jeszcze dokładniejszego prześledzenia zmian ilości mikroorganizmów w kiszonce ziemniaczanej podczas fermentacji, przeprowadzono jeszcze dwa doświadczenia nad kiszonkami ziemniaczanymi z dodatkiem koniczyny. Doświadczenia te miały tylko po dwie kombinacje: I — kontrolna, bez dodatków i II z dodatkiem świeżej koniczyny. Ważniejsze wyniki zostały zebrane w tabl. V.

Tablica V

Ilości różnych grup drobnoustrojów w tysiącach na 1.0 g świeżej masy kiszonki.
Doświadczenie 5
Kombinacja: ziemniaki parowane + 10% świeżej koniczyny

Количество разных групп микроорганизмов в тысячах на 1 г сырой массы силоса
Опыт 5. Комбинация: запаренный картофель + 10% свежего клевера

The number of microorganisms in thousands per 1,0 g of silage
Steamed potatoes + 10% of green clover

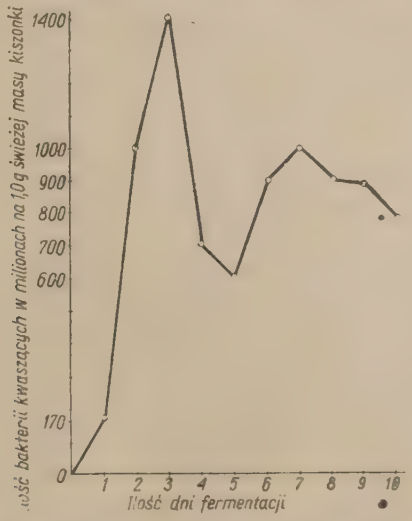
Rodzaj drobnoustrojów	Ilość dni fermentacji						
	0	1	2	4	6	8	21
Bakterie kwaszące	230	105700	5300000	2900000	2800000	1600000	190000
Bakterie z grupy *coli-aerogenes*	<0,1	1,2	20	1,6	< 0,1	< 0,1	—
Bakterie proteolityczne	103	30	50	< 0,1	< 0,1	—	—
Drożdże	<0,1	< 0.1	1,3	6	70	132	—

Jak widać z tabl. V, ilość bakterii fermentacji mlekowej osiąga przy dodatku 10% świeżej koniczyny do ziemniaków, największy wzrost po 2 dniach fermentacji, po czym następuje stopniowy spadek ich liczebności. Bakterie z grupy *coli - aerogenes*, po osiągnięciu maksimum również po 2 dniach fermentacji, następnie szybko zanikają. Podobnie ograniczeniu ulega wzrost bakterii proteolitycznych, których ilość maleje w ciągu pierwszego tygodnia wraz z postępem fermentacji w kiszonce. W tym doświadczeniu, w ciągu 8 dni fermentacji stale wzrastała ilość drożdży.

W doświadczeniu nr 6 (wykres 1) podobnie jak w doświadczeniu nr 5, mamy tylko dwie kombinacje: I — ziemniaki kontrolne i II — ziemniaki z dodatkiem 20% świeżej koniczyny. W doświadczeniu tym starano się prześledzić dokładnie codzienne zmiany ilości bakterii w kiszonce w przeciągu 10 dni.

Śledząc z pomocą tego wykresu rozwój bakterii kwaszących widzimy, jak gwałtownie wzrasta ich ilość w kiszonce zaraz w pierwszych dniach i że maksimum ich rozwoju następuje po 3 dniach fermentacji.

Analizując doświadczenie nr 6 wyliczyliśmy w nim względne nasilenie rozwoju bakterii kwaszących podczas fermentacji, przyjmując najwyższą ilość bakterii kwaszących w kiszonce za 100. I tak, po 4 dniach stwierdzamy gwałtowny spadek liczby bakterii do około 45. Jednakże już w następnych dniach obserwujemy ponowny wzrost o około 20% tak, że otrzymujemy po 7 dniach fermentacji drugie maksimum wzrostu o wartości 60. Od tego dopiero momentu zaznacza się stopniowy, lecz nieustanny spadek ilości bakterii kwaszących w kiszonce. Podobny przebieg rozwoju mikroorganizmów kwaszących obserwujemy w doświadczeniach nr nr 1 — 5. We wszystkich doświadczeniach maksimum wzrostu bakterii fermentacji mlekowej znajdowano po 2 — 3 dniach fermentacji.



Rys. 1. Rozwój mikroflory kwaszącej podczas fermentacji kiszonki ziemniaczanej. Doświadczenie 6. Kombinacje: ziemniaki parowane + 20% świeżej koniczyny.

Рис. 1. Развитие кислотообразующих бактерий во время ферментации картофельного силоса. Опыт 6. Варённый картофель + 20% свежего клевера.

Fig. 1. The number of acidifieing bacteria during the fermentation of potato silage. Experiment 6. Silage mixture: steamed potato — mash + 20% of green clover.

W doświadczeniach nr 5 i nr 6, aby uniknąć zakażenia kombinacji kontrolnej (same parowane ziemniaki), otworzono słoje i pobrano próbki do badań mikrobiologicznych dopiero po zakończeniu doświadczenia. W tych warunkach ziemniaki kontrolne uchroniły się od przypadkowych

zakażeń, gdyż nie stwierdzono w nich wzrostu żadnych bakterii kwaszących. Obfity wzrost tych bakterii stwierdzono natomiast w kombinacji z dodatkiem koniczyny (p. wykres 1).

Na wiosnę 1952 r. przeprowadzono doświadczenie nr 7 o dwóch kombinacjach: I — kontrola (same parowane ziemniaki), II — ziemniaki z dodatkiem 40% świeżej koniczyny. Kombinację kontrolną tego doświadczenia, podobnie jak odpowiednie kombinacje doświadczeń nr nr 5 i 6, zbadano dopiero po zakończeniu fermentacji.

Badania mikrobiologiczne w tym doświadczeniu obejmowały: bakterie kwaszące, bakterie gazujące, bakterie z grupy *coli - aerogenes*, bakterie proteolityczne i drożdże. Z analiz chemicznych przeprowadzono: określenie metodą Leppera (1938) ogólnej ilości kwasów: mlekowego, octowego i masłowego. Określono również ilość białka surowego w ziemniakach i w świeżej koniczynie. Wyniki doświadczenia nr 7 zebrano w tabl. VI.

W doświadczeniu tym najsilniejszy rozwój mikroflory kwaszącej występuje po 2 dniach fermentacji. Po przejściowym zmniejszeniu się liczby bakterii kwaszących w ciągu pierwszych kilku dni, ilość ich ponownie wzrasta i po 6 dniach fermentacji mamy drugie maksimum, nieco niższe od pierwszego. Przez następnych kilka dni ilość bakterii fermentacji mlekowej utrzymuje się prawie na tym samym poziomie i dopiero po 10 dniach fermentacji obserwujemy stały spadek ich liczby. W tym doświadczeniu nie stwierdzono zupełnie występowania bakterii z grupy *coli - aerogenes*. Natomiast bakterie proteolityczne i gazujące rozwijały się początkowo dosyć silnie, ale już po 7 dniach ilość ich spadła poniżej 1000 na 1 g świeżej masy kiszonki. Bardzo dobrze rozwinęły się drożdże. Znaleziono je w kiszonce dopiero po 3 dniach fermentacji (tabl. VI), po czym ich ilość stale się zwiększała i po 42 dniach fermentacji wynosiła około 2 milionów na 1 g świeżej masy kiszonki.

Przeprowadzone badania metodą Leppera wykazały w kiszonce: kwasu mlekowego 2.58%, kwasu octowego 0.56%, kwasu masłowego 0.0% r, a więc prawidłowe ilości kwasów organicznych.

Badania potencjometryczne po 42 dniach fermentacji wykazały pH 4,2. Kiszonka uzyskana w doświadczeniu nr 7, poddana ocenie wg klucza Fliega, otrzymała 34 punktów, a więc została oceniona jako bardzo dobra. Kiszonka ta odznaczała się przyjemnym aromatem i była łakomie zjadana przez zwierzęta.

Oznaczenie ilości białka w tej kiszonce met. Kjeldahla wykazało białka surowego: w ziemniakach 1.95%, w koniczynie 3,43%, w gotowej kiszonce 2,31%.

Tablica VI

Ilości różnych grup drobnoustrojów w tysiącach na 1,0 g świeżej masy kiszonki.
Doświadczenie 7
Kombinacja: ziemniaki parowane + 40% świeżej koniczyny

Количество разных групп микроорганизмов в тысячах на 1 г сырой массы силоса
Опыт 7. Комбинация: варённый картофель + 40% свежего клевера

The number of microorganisms in potato silage (in thousands per 1,0 g)
Steamed potatoes + 40% green clover

Ilość dni fermentacji	Rodzaj drobnoustrojów				
	Bakterie fermentacji mlekowej	Bakterie z grupy *coli-aerogenes*	Bakterie proteolityczne	Bakterie gazujące	Drożdże
0	10	< 0,1	0,5	< 0,1	< 0,1
1	775000	< 0,1	8	< 0,1	< 0,1
2	2590000	< 0,1	10	107	< 0,1
3	1690000	< 0,1	10	20	< 0,1
4	828000	< 0,1	< 10	20	0,7
5	574000	< 0,1	< 1	18	2,4
6	2030000	< 0,1	< 1	< 10	8,3
7	1230000	< 0,1	< 1	< 1	35,9
8	1230000	< 0,1	< 1	< 1	40,6
9	1200000	< 0,1	< 1	< 1	130
10	1170000	—	—	—	160
14	990000	—	—	—	—
21	747000	< 0,1	< 1	< 1	—
42	38000	< 0,1	< 1	< 1	1720

Z obliczeń wynikałoby, że dodatek 40% koniczyny wzbogaca użyte ziemniaki o 13,72 g białka surowego. W sumie z białkiem samych ziemniaków otrzymalibyśmy 25,42 g białka surowego na 1 kg mieszanki, czyli 2,54%.

Porównując zawartość białka surowego w użytej mieszance surowców z jego ilością znalezioną w gotowej kiszonce znajdujemy, że podczas zakiszania nastąpiło zmniejszenie się jego ilości o około 0,2%, co odpowiada około 9% strat białka surowego.

Na podstawie uzyskanych wyników z doświadczeń kiszonkowych można na ogół stwierdzić, że dodatek do parowanych ziemniaków świeżej koniczyny w ilości do 40% pozwala uzyskać kiszonki dobrej jakości.

Śledząc rozwój mikroflory kwaszącej w tych kiszonkach widzimy, że początkowo we wszystkich kombinacjach kiszonkowych (z wyjątkiem kombinacji zakażanej kwaśnym mlekiem) występowała przeważnie mikroflora niekwasząca. Dopiero po kilku dniach następował silny a nawet gwałtowny rozwój bakterii kwaszących. W poniższej tabelce podano w procentach ilości różnych grup drobnoustrojów znalezionych w surowcu w chwili nastawienia kiszonki (doświadczenie nr 2).

Tablica VII

Względne ilości różnych grup mikroflory w chwili nastawienia kiszonki ziemniaczanej w doświadczeniu nr 2, w %%

Kombinacja	Bakterie kwaszące	Bakterie niekwaszące	Bakterie proteolityczne	Drożdże
I	0	94	6	0
III	9	73	9	9
IV	18	42	18	22

Po trzech dniach fermentacji kiszonek, bakterie kwaszące opanowały środowisko tak, że suma wszystkich innych znalezionych drobnoustrojów nie przekraczała w kiszonce 0,002% ogólnej ilości mikroflory. Tylko drożdży było więcej, przy czym w kombinacji IV ilość ich wynosiła po trzech dniach fermentacji 0,2% ogólnej ilości drobnoustrojów w kiszonce.

Szczepy kwaszące wyosobniano wyłącznie z kombinacji kiszonkowej: parowane ziemniaki z dodatkiem świeżej koniczyny. Cechy diagnostyczne szczepów podane są w tabl. VIII i IX. Widzimy, że z 44 wyosobnionych szczepów tylko 8 zakwaszało pożywkę dla bakterii mlekowych do pH poniżej 5 w temp. 28° w ciągu 3 dni. Najszybciej kwaszące szczepy należały do ziarniaków (nr nr 6, 34, 32, 33, 31, 21). Szybko też kwasiły dwa szczepy pałeczek (nr nr 42 i 35). Kolejność numerów szczepów ułożono według ich energii zakwaszania, zaczynając od szczepu nr 6 (kwasi do pH = 4,04), a kończąc na szczepie nr 35 (kwasi do pH = 4,99).

Szczepy najszybciej kwaszące wykazały swoiste uzdolnienia fermentacyjne. Mianowicie, szczep najszybciej kwaszący (nr 6) fermentuje tylko 2 z badanych cukrów diagnostycznych (maltozę i laktozę). Szczep drugi z kolei pod względem uzdolnień fermentacyjnych (nr 34) fermentuje też 2 cukry (maltozę i sacharozę). Natomiast szczepy wolniej kwaszące (nr nr 31, 32) fermentują po 4 cukry, a szczepy najwolniej kwaszące (nr nr 21, 35), fermentują po 5 cukrów, czyli wszystkie cukry użyte do diagnozy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Porównując różne sposoby przyrządzania kiszonek z ziemniaków stwierdzono:

1. Prawidłowo przebiegającą fermentację przy zakażeniu zakiszanych ziemniaków zsiadłym mlekiem i w kombinacjach z dodatkiem koniczyny czerwonej. Tak przyrządzone kiszonki były gotowe po 4 — 6 tygodniach; były trwałe i miały przyjemny aromat.

2. Porównując zsiadłe mleko i koniczynę jako materiał szczepionkowy widzimy, że dodając do uparowanych ziemniaków 15% zsiadłego mleka wprowadziliśmy około 40 milionów bakterii kwaszących na 1 g ziemniaków, a 20—40% dodatek świeżej koniczyny czerwonej dostarczał ziemniakom około 15 tysięcy bakterii kwaszących na 1 g świeżej masy, a więc około 3 tysiące razy mniej (tabl. IV).

3. Oprócz działania jako źródło swoistych zespołów mikroflory koniczyna wzbogacała przeznaczony do kiszenia surowiec ziemniaczany w dość duże ilości białka (przy 40% dodatku koniczyny powiększano ilość białka o około 0,6%) i innych składników pokarmowych. Możemy przyjąć orientacyjnie, że podczas gdy w samych ziemniakach stosunek węglowodanów do białka wynosił około 10:1, przy 40% dodatku koniczyny stosunek ten równał się około 7:1. Według Kirscha (Szember, 1952) nie jest to stosunek za wysoki przy wyrobie kiszonek, co potwierdziły nasze doświadczenia (patrz punkt 1 i 3).

4. Oceniając wg klucza Fliega otrzymane kiszonki ziemniaczane z dodatkiem koniczyny i biorąc za podstawę procentowy stosunek wzajemny kwasów: mlekowego, octowego i masłowego, uzyskano ocenę bardzo dobrą (p. opis doświadczenia nr 7). Nadto kiszonki te były łakomie zjadane przez zwierzęta.

5. Kiszonki ziemniaczane z dodatkiem koniczyny, zakwaszone sztucznie kwasami mineralnymi do pH około 4.0 wykazywały zahamowanie wzrostu nawet bakterii kwaszących (tabl. I — IV). Kiszonki te miały ostry zapach i bardzo szybko pleśniały.

6. Kiszonki z ziemniaków przyrządzone z dodatkiem 15% zsiadłego mleka dojrzewały po 4 tygodniach, a więc o 2 tygodnie szybciej niż w kombinacji z koniczyną. Odznaczały się one charakterystycznym zapachem kwaśnego mleka i były mniej trwałe niż kiszonki z koniczyną. Natomiast kiszonki ziemniaczane z dodatkiem koniczyny miały przyjemny zapach owocowy i były bardzo trwałe.

7. Badania nad mikroflorą surowców i nad jej rozwojem w kiszonkach wykazały, że w świeżej koniczynie bakterie kwaszące były zawsze

Tablica VIII

Opis wyodrębnionych szczepów bakterii kwaszących

Кислотообразующие бактерии из силоса

The characteristics of acidifieing bacteria isolated from the silage

Nr szczepu	Wielkość komórek w μ	Maksimum temperatury wzrostu				Wzrost w stężeniach NaCl				Redukcja błękitu metylenowego			Fermentuje						Wzrost na ziemniaku	Wzrost na mleku z purpurą bromokrezolową	Zakwaszа pożywkę płynną w ciągu 5 dni do pH	Uwagi
		30°	35°	40°	45°	2%	4%	6,5%	7,5%	0,01%	0,1%	0,3%	Sacharozę	Laktozę	Maltozę	Rafinozę	Arabinozę	Mannit				
		Ziarniaki																				
1	1,0×1,2	++	++	—	○	++	++	++	—	R	R	R	K	○	K	K	○	K	+	○	5,38	
2	0,9×1,1	++	+	—	+	++	++	++	++	R	R	R	○	○	K	K	K	K	+	○	5,90	
3	1,2×1,4	++	++	+	○	++	++	++	+	R	R	R	K	○	K	○	K	K	+	○	—	
4	0,9×1,1	+	++	+	○	++	++	++	○	R	R	R	K	K	K	K	○	K	+	+	—	szczep zbliżony do *Streptococcus faecalis*
5	0,5×0,5	++	++	+	○	++	++	+	○	R	○	○	○	K	K	○	○	K	+	+	5,08	Fermentuje słabo
6	0,8×0,9	++	++	+	○	++	++	○	○	R	R	○	○	K	K	○	○	○	○	+	4,04	Szczep zbliżony do *Streptococcus lactis*
7	1,0×1,2	++	++	++	+	++	++	++	○	R	R	R	K	K	K	○	K	K	+	+	5,06	Fermentuje glicerynę
8	0,6×0,8	++	++	+	○	++	+	○	○	○	○	R	○	○	K	K	K	○	○	○	—	
9	0,6×0,8	+	+	○	○	++	++	+	○	R	R	○	KG	○	KG	KG	KG	KG	+	○	—	Szczep na pożywce płynnej z glukozą bardzo silnie gazuje
10	0,8×0,9	+	++	++	+	++	++	+	○	R	R	R	KG	KG	KG	KG	○	KG	○	+	5,97	Szczep zbliżony do *Streptococcus faecalis* bardzo silnie gazuje
11	0,8×0,9	++	++	++	+	++	+	+	○	R	R	R	KG	KG	KG	KG	○	KG	○	+	5,97	„
12	0,7×0,9	+	++	+++	+	++	++	+	+	R	R	R	KG	KG	KG	KG	○	KG	+	++	—	Fermentuje glicerynę

16	0,8×1,0	+	++	++	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	○	○	K	○	+	○	
17	0,7×0,9	+	++	++	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	K	○	○	+	○	
18	0,6×0,8	+	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	○	○	○	−	5,24	
19	0,9×1,1	++	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	○	○	○	+	5,24	
20	0,6×0,8	+	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	○	K	K	○	○	○	−		
21	0,8×1,0	+	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	K	○	○	+	4,94	
22	0,8×1,0	++	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	K	○	○	+	−	
23	0,8×0,9	++	++	+	○	○	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	K	○	○	+	−	
24	1,0×1,2	++	++	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	K	K	K	○	○	○	○	4,52	
25	0,5×0,5	+	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	○	○	○	+	5,06	
26	0,6×0,8	++	+	○	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	○	○	○	○	+	−	
27	0,6×0,7	++	++	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	K	○	○	○	○	○	−	−	
28	0,9×1,1	++	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	○	K	○	○	++	−	
29	0,7×0,8	+	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	○	K	K	K	○	○	○	−	
30	0,8×1,0	++	++	+	○	+	○	○	○	○	○	○	K	K	K	K	K	○	○	++	−	
31	0,6×0,8	++	++	+	○	++	+	○	○	○	○	○	K	K	K	K	○	○	○	++	4,62	
32	0,8×1,0	++	++	○	○	++	+	○	○	○	○	○	K	K	K	K	○	○	○	+	−	
33	0,6×0,8	++	++	○	○	+	○	○	○	○	○	○	○	○	K	K	○	K	○	○	−	
34	0,7×0,8	++	+	○	○	++	++	○	○	○	○	○	K	○	K	○	○	○	○	○	4,24	

Objaśnienia: O brak wzrostu, + słaby wzrost, ++ silny wzrost, R redukuje błękit metylenowy, K produkuje kwas, G produkuje gaz, — nie badano

Tablica IX

Opis wyodrębnionych szczepów bakterii kwaszących

Кислотообразующие бактерии из силоса

The characteristics of acidifieing bacteria isolated from the silage

Nr szczepu	Wielkość komórek w μ	Maksimum temperatury wzrostu				Wzrost w stężeniach Na Cl				Redukcja 0,01% błękitu metylenowego	Fermentuje						Wzrost na ziemniaku	Wzrost w mleku z purpurą bromokrezolową	Zakwaszа pożywkę płynną w ciągu 3 dni do pH	Uwagi
		30°	35°	40°	45°	2%	4%	6,5%	7,5%		Sacharozę	Laktozę	Maltozę	Rafinozę	Arabinozę	Mannit				
		Pałeczki																		
35	0,6×1,4-1,6	++	+	○	○	++	++	+	+	○	K	K	K	K	○	K	○	++	4,99	
36	0,6-0,7×1,2-1,3	++	+	○	○	++	++	○	○	R	K	K	K	K	K	○	○	++	—	Szczep zbliżony do *Streptobacterium plantarum*
37	0,5×1,2	++	+	○	○	++	++	+	+	○	K	K	K	K	○	○	○	++	—	Szczep zbliżony do *Thermobacterium intestinale*
38	0,5×1,6-1,8	++	++	++	+	++	++	+	○	○	K	K	K	K	K	K	+	++	—	Fermentuje skrobię
39	0,5×1,5	++	++	+	○	+	+	○	○	○	○	○	○	K	○	K	○	○	—	
40	0,5×1,3-1,4	++	+	○	○	+	○	○	○	R	K	K	K	○	○	K	○	++	—	
41	0,5×1,7	++	++	+	○	+	○	○	○	○	K	K	K	K	○	○	+	+	—	Szczep zbliżony do *Lactobacillus bifidus* Fermentuje skrobię
42	0,7×1,2	++	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	K	K	○	K	○	○	4,95	
43	0,8-0,9×1,2-1,4	++	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	K	○	K	K	○	○	—	Szczep zbliżony do *Lactobacillus brevis*
44	0,4-0,5×1,3-1,4	++	++	++	+	+	○	○	○	○	K	○	K	○	○	K	○	○	—	Szczep zbliżony do *Lactobacillus leichmannii*

Objaśnienia: ○ brak wzrostu; + słaby wzrost; ++ silny wzrost. R redukuje błękit metylenowy; K produkuje kwas; G produkuje gaz; — nie badano

początkowo nieliczne. Mikroflorę niekwaszącą reprezentowały przede wszystkim laseczki typu *subtilis*, pałeczki typu *fluorescens*, bakterie z grupy *coli - aerogenes* i drożdże. Szybki rozwój bakterii kwaszących w kiszonce powodował zanik innych mikroorganizmów z wyjątkiem drożdży, którym obniżenie się odczynu kiszonki nie przeszkadzało w rozwoju (tabl. II — VI).

8. Podczas badania rozwoju mikroflory w kiszonkach wyosobniono z nich ogółem 44 szczepy bakterii kwaszących. Wśród nich znaleziono kilka o cechach zbliżonych do znanych gatunków takich jak: *Streptococcus faecalis* (szczepy nr nr 4, 10, 11, 12), *Streptococcus lactis* (szczep nr 6), *Thermobacterium intestinale* (szczep nr 37), *Lactobacillus brevis* (szczep nr 43) *Streptobacterium plantarum* (szczep nr 36), *Lactobacillus bifidus* (szczep nr 41) i *Lactobacillus leichmannii* (szczep nr 44). Pozostałych szczepów nie udało się bliżej określić.

9. W badanych kiszonkach nie zaobserwowano przewagi jakiegoś jednego gatunku bakterii kwaszących. We wszystkich kombinacjach kiszonkowych można było znaleźć różne gatunki bakterii fermentacji mlekowej.

OGÓLNE WNIOSKI

Stwierdzono, że z ziemniaków można otrzymać z łatwością prawidłowe i bardzo pożywne kiszonki, dodając do tego surowca po jego uparowaniu kilkadziesiąt procent świeżej masy roślin motylkowych i wzbudzając w nich biologiczny proces zakwaszania.

Zastosowanie metody chemicznej „A.I.V" przy zakiszaniu mieszanki ziemniaków z koniczyną nie dało w naszych doświadczeniach dobrych wyników; otrzymane kiszonki miały ostry zapach i szybko pleśniały.

Kiszonki z ziemniaków przyrządzone z zsiadłym mlekiem odznaczały się mniejszą trwałością niż kiszonki z dodatkiem koniczyny i zachowały zapach kwaśnego mleka.

Autor sądzi, że ze względu na wartość odżywczą byłoby celowe stosowanie kiszonek ziemniaczanych z dodatkiem 20 — 40% świeżej koniczyny, co wymaga jeszcze potwierdzenia w liczniejszych próbach żywieniowych.

A. Шембер

КАРТОФЕЛЬНЫЕ СИЛОСЫ И ИХ МИКРОФЛОРА

Резюме

Целью настоящей работы является выработка методов продукции ценных в питательном отношении картофельных силосов. Силосы приготовлялись из запаренного картофеля с прибавлением разных количеств клевера (10 – 40%). Применялись также комбинации, запаренный картофель с добавлением клевера, заквашивая искусственно

эту смесь до pH около 4,0 посредством минеральных кислот по методу „A. I. V.", и прибавлением 15% тощего, кислого молока (см. табл. I–VI). Цельно выше упомянутых прибавок было обогащение силосованного картофеля белковыми веществами и вместе с тем внесение натуральной микрофлоры, а м. пр. молочнокислых бактерий.

В своей работе автор обратил особое внимание на развитие микрофлоры в силосах. Исследования начались в 1950 г., а были закончены в 1952 г. Было проведено 7 опытов, в которых применялись выше указанные комбинации. Пользуясь чашечным методом автор определил количество бактерий молочнокислых, протеолитических термофильных и не образующих кислот, бактерий из группы *coli-aerogenes*, а также количество газообразуюших бактерий и дрожжей. Во время опытов были выделены кислотообразующие формы, которые автор пробовал определить, пользуясь определителем Берджи и Красильникова. Всего было выделено 44 кислотообразующие формы, из которых удалось определить 10, как более или менее сходных с известными уже видами.

Автором были проведены также химические анализы, в частности автор определил: реакцию силосов, общую кислотность и по методу Леппера общее количество молочной, уксусной, и масляной кислот.

Пробы для микробиологических и химических исследований автор брал в начале и спустя 3, 7, 10, 21, 42 суток ферментации силосов (табл. I – IV), а также ежедневно во время первых 10 дней ферментации силосов (табл. V – VI и рис. I).

Из всех проведеных опытов следует, что найлучший силос получается из запаренного картофеля с прибавлением к нему 20 – 40% свежего клевера (см. табл. I – VI).

Эти силосы характеризировались большой устойчивостью, приятным ароматом и очень охотно были съедаемы животными.

A. Szember

THE SILAGE FROM POTATOES AND ITS MICROFLORA

Summary

It was the author's aim to find the method of preparing potato silage of high feeding value. Various silages were prepared from steamed potato - mash with 10—40% of green clover. Some samples were additionally acidified with mineral acids (according to A.I.V. method), others with sour skim milk (Tables I—VI).

The clover and skim-milk were added to enrich the silage in protein and in desirable microorganisms.

The investigations were conducted from 1950 to the year 1952. During this seven experiments with silages of various composition were made. The number of: lactic acid bacteria, proteolytic bacteria, thermophilic bacteria, bacteria of colon-aerogenes group, gas producing bacteria, non-acidifieing bacteria and yeast, was estimated by plate count. The lactic acid bacteria were identified according to Bergey's and Krasilnikov's Manuals. There were isolated 44 strains of lactic acid bacteria. Ten of these were indentified as: *Streptococcus faecalis* — 4 strains, *Str. lactis* — 1, *Thermobacterium intetinale* — 1, *Streptobacterium plantarum* — 1, *Lactobacillus brevis* — 1, *Lactobac. bifidus* — 1, *Lactobac. leichmanii* — 1 strain.

After 3, 7, 10, 21 and 42 days of fermentation, pH, the total amount of acids, the amount of lactic, acetic and butyric acids were determined (Tables I—IV)

In some of the samples these determinations were made every day during the first ten days period of fermentation (Tables V—VI, Fig. 1).

The best silage was obtained from steamed potato-mash mixed with 20—40% of green clover (Tables I—VI). The silage kept well during storage, its acidity was normal, it had good aroma and high feeding value.

LITERATURA

1. Bergey's: Manual of Determinative Bacteriology, wyd. 6, The Williams i Wilkins Co, Baltimore 1948. 2. Claus G.: Mikroskopische und Biologische Untersuchung von Futtermitteln, Handbuch der Landwirtsch. Versuchs — u. Untersuchungs Methodik, J. Neumann, Berlin 1941. 3. Fred E. B. i Waksman S. A.: Laboratory Manual of General Microbiology, McGraw-Hill Book Co. Nowy Jork 1928. 4. Giltner W.: Laboratory Manual in General Microbiology, wyd. 3, J. Wiley, Nowy Jork 1926. 5. Kellner O.: Die Ernährung die Landwirtschaftlichen Nutztiere, wyd. 2, Paul Parey, Berlin 1906. 6. Kolowca J.: Sprawa pastewnego użytkowania łubinu gorzkiego (ziarna i zielonej masy) za pomocą różnych metod jego zakiszania, Annales UMCS Lublin, Sec. E, 1951. 6:39. 7. Krasilnikow N. A.: Opredielitiel bakterii i aktinomicietow, Akad. Nauk ZSRR, Moskwa 1949. 8. Lepper W.: Einheitliche Apparat und einheitliche Gleichungen zur Bestimmung der Essig-und Buttersäure und Milchsäure in Sauerfutter, Zeitschr. f. Tierern. u. Futtermittelkunde, 1938, 1:187. 9. Pederson C. S., Albury M. N.: Effect of Temperature upon Bacteriological and Chemical Changes in Fermenting Cucumbers, Agr. Exp. Sta. Geneva, (Nowy Jork), Bul. 744, 1950. 10. Pijanowski E.: Chemia i higiena mleka, PIWR, Warszawa 1948. 11. Prescott C. S., Winslow C. E. A., Mc Crady M. H.: Water Bacteriology, wyd. 6, J. Wiley, Nowy Jork 1946. 12. Szember A.: Zarys rozwoju badań mikrobiologicznych nad kiszonkami, 1952, w druku. 13. Tanner F. W.: Practical Bacteriology, wyd. 2, J. Wiley, Nowy Jork, 1947. 14. Virtanen A. I.: Silage by the AIV method, The Economic Proceedings of the Royal Dublin Society, 1947, 3:311

SPIS TREŚCI

str.

Opieńska-Blauth J. i Iwanowski H.: Wpływ selenu na wzrost i przemianę węglowodanową w płynnych hodowlach *E. coli* 273

Lityński T., Jurkowska H. i Żak Z.: Wpływ węgla brunatnego na produkcję kwasu cytrynowego u kropidlaka *(Aspergillus niger)* 291

Daszkiewicz I. M. i Wroński E.: Badania nad *Brucella abortus*, określenie fazy *S* i *R* 301

Gołębiowska J. i Wróbel T.: Przydatność różnych podłoży do produkcji szczepionek dla roślin motylkowych . 313

Gołębiowska J.: Wpływ żywienia *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* różnymi związkami węgla na ich aktywność w symbiozie z rośliną 327

Szember A.: Kiszonki ziemniaczane i ich mikroflora . 339

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

Опенска-Блуят Я. и Ивановски Г.: Влияние селена на рост и метаболизм углеводов в жидких культурах *Escherichia coli* 273

Литински Т. Юрковска Х. и Жак З.: Влияние бурого угля на продукцию лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* 291

Дашкевич И. М. и Вронски Э.: Исследования над *Brucella abortus:* определяние фаз „S" и „R" 301

Голембиовска Я. и Врубель Т.: Пригодность разных сред для продукции препаратов клубеньковых бактерий для инокуляции бобовых растений 3

Голембиовска Я.: Влияние питания *Rhizobium trifolii* и *Rh. meliloti* разными соединениями углерода на их активность в симбиозе с растениями 327

Шембер А.: Картофельные силосы и их микрофлора . . . 339

CONTENTS

page

Opieńska-Blauth J. and Iwanowski H.: The effect of selenite on the growth and glucose metabolism in the fluid cultures of *Escherichia coli* 273

Lityński T., Jurkowska H. and Żak Z.: The influence of the lignite on the citric acid production by *Aspergillus niger* 291

Daszkiewicz I. M and Wroński E.: The differentiation of *S* and *R* phases in *Brucella abortus* 301

Gołębiowska J. and Wróbel T.: The usefulness of various media for production of root nodule bacterial preparations for inoculations of leguminous plants 313

Gołębiowska J.: The effect of the carbon source in the cultures of *Rh. trifolii* and *Rh. meliloti* upon the nitrogen fixation in the inoculated plants 327

Szember A.: The silage from popatoes and its microflora . . 339

SKOROWIDZ AUTORÓW

BALICKA N.: Wpływ siewu mieszanego koniczyny z tymotką na mikroflorę ich rhizosfery . . . . . str. 53

BUJAK St.: Przydatność wycierki ziemniaczanej i ługów posiarczynowych do produkcji drożdży paszowych 65

BYLICKA H., JAROSZ B., NOWICKA I., KUNICKI-GOLDFINGER WŁ.: Substancje antybiotyczne porostów 185

DASZKIEWICZ I. M., WROŃSKI E.: Badania nad *Brucella abortus* określanie fazy S i R 301

DUDA J., PĘDZIWILK Fr.: Wpływ preparatu 2,4D i dwunitrokrezolu na mikroflorę gleb 193

GOŁĘBIOWSKA J.: Wpływ żywienia *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* różnymi związkami węgla na ich aktywność w symbiozie z rośliną . . 328

GOLĘBIOWSKA J., WRÓBEL T.: Przydatność różnych podłoży do produkcji szczepionek dla roślin motylkowych 313

GUZOWSKA B., ORZECHOWSKA B., KUNICKI-GOLDFINGER WŁ.: Własności fitoncydów cebuli *Allium cepa* L. 175

HAUKE-PACEWICZOWA T.: Szczepionki dla *Galega officinalis* . . 36

IWANOWSKI H.: patrz Opieńska-Blauth J. 273

JAROSZ B.: patrz Bylicka H. 185

JURKOWSKA H.: Zdolność przystosowania się kropidlaka *(Aspergillus niger)* do miedzi 107

JURKOWSKA H.: patrz Lityński T. 291

KLUCZYCKI K.: Studia nad wartością grzybobójczą niektórych produktów oraz praktyczna metodyka jej badania 223

KOBUS J.: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych 133

KUNICKI-GOLDFINGER WŁ.: patrz Guzowska B. 175

KUNICKI-GOLDFINGER Wł.: patrz Bylicka H. 185

KUŹNIAR K.: Energia rozkładu błonnika w glebach Parku Narodowego w Pieninach 52

KUŹNIAR K.: Energia rozkładu błonnika w glebach Białowieskiego Parku Narodowego . . . . . str. 257

LITYŃSKI T., JURKOWSKA H., ŻAK Z.: Wpływ węgla brunatnego na produkcję kwasu cytrynowego u kropidlaka *(Aspergillus niger)* 291

MALISZEWSKA W.: Charakterystyka mikrobiologiczna gleb z doświadczeń statycznych w Gołębiewie . . . . . „ 123

NOWICKA I.: patrz Bylicka H. . . . . „ 185

NOWOTNY-MIECZYŃSKA A.: Wpływ niektórych czynników na pigmentację brodawek roślin motylkowych . . . . . „ 42

NOWOTNY-MIECZYŃSKA A., RUSZKOWSKA M.: Wpływ azotu mineralnego na rozwój szczepionych roślin motylkowych . . . . „ 205

OPIEŃSKA-BLAUTH J., IWANOWSKI H.: Wpływ selenu na wzrost i przemianę węglowodanową w płynnych hodowlach *E. coli* . . „ 273

ORZECHOWSKA B.: patrz Guzowska B. . . . . „ 175

PĘDZIWILK Fr.: patrz Duda J. . . . . „ 193

RUSZKOWSKA M.: patrz Nowotny-Mieczyńska A. . . . . „ 205

SKARŻYŃSKI B.: patrz Szczepkowski T. W. . . . . „ 93

STRZEMSKA J.: Zagadnienie mikoryzy w zbóż cz. II Żyto . . . „ 24

SUPIŃSKA-JAKUBOWSKA J.: Wytwarzanie acetoiny przez *Streptococcus diacetilactis* . . . . . „ 151

SZCZEPKOWSKI T. W., SKARŻYŃSKI B.: Biochemia bakterii siarkowych Cz. I. Układ cytochromowy i hemoproteidy *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans* . . . . . „ 93

SZEMBER A.: Kiszonki ziemniaczane i ich mikroflora . . . . „ 339

SZYMONA M.: Wpływ fitoncydów *Allium sativum* na wzrost i oddychanie niektórych grzybów chorobotwórczych . . . . . „ 5

WROŃSKI E.: patrz Daszkiewicz I. M. . . . . „ 301

WRÓBEL T.: Wpływ herbicidu 2,4-D na rozwój *Rhizobium* . . . . „ 39

WRÓBEL T.: patrz Gołębiowska J. . . . . „ 313

ŻAK Z.: patrz Lityński T. . . . . „ 291

SKOROWIDZ RZECZOWY

str.

Acetoina
— wytwarzanie przez *Str. diacetilactis* (SUPIŃSKA - JAKUBOWSKA J.) 151

Allium cepa
— fitoncydy (GUZOWSKA B. i in.) 175

Allium sativum
— wpływ fitoncydów na grzyby chorobotwórcze (SZYMONA M.) . 5

Aspergillus niger
— przystosowanie się do miedzi (JURKOWSKA H.) 107
— wpływ węgla brunatnego na produkcję kwasu cytrynowego (LITYŃSKI T. i in.) 291

Azot mineralny
— wpływ na rośliny motylkowe (NOWOTNY - MIECZYŃSKA A., RUSZKOWSKA M.) 205

Bakterie siarkowe
— układ cytochromowy i hemoproteidy (SZCZEPKOWSKI T. W., SKARŻYŃSKI B.) 93

Błonnik
— rozkład w glebie (KUŹNIAR K.) 52, 257

Brucella abortus
— określanie fazy *S* i *R* (DASZKIEWICZ J. M., WROŃSKI E.) . . 301

Cytrynowy kwas
— wytwarzanie u kropidlaka pod wpływem węgla (LITYŃSKI T. i in.) 291

Drożdże paszowe
— przydatność wycierki ziemniaczanej i ługów posulfitowych do produkcji (BUJAK ST.) 65

Escherichia coli
— wpływ selenu na wzrost i metabolizm węglowodanów (OPIENSKA-BLAUTH J., IWANOWSKI H.) 273

Fitoncydy
— *Allium cepa* (GUZOWSKA B. i in.) 175
— *Allium sativum*, wpływ na grzyby chorobotwórcze (SZYMONA M.) 5

Galega officinalis
— szczepionki (HAUKE - PACEWICZOWA T.) 36

Gleby, charakterystyka mikrobiologiczna (MALISZEWSKA W.) . . . 123
Grzybobójcze produkty, metodyka badania (KLUCZYCKI K.) . . . 223
Herbicydy
— wpływ na mikroflorę gleby (DUDA J., PĘDZIWILK Fr.) . 193
— wpływ na rozwój *Rhizobium* (WRÓBEL T.) 39
Kiszonki ziemniaczane, mikroflora (SZEMBER A.) 339
Kropidlak p. *Aspergillus niger*.
Miedź
— przystosowanie się kropidlaka (JURKOWSKA H.) . . . 107
Mikoryza u zbóż
— żyto (STRZEMSKA J.) 24
Pigmentacja brodawek
— wpływ niektórych czynników (NOWOTNY - MIECZYŃSKA A.) . 42
Porosty
— substancje antybiotyczne (BYLICKA H. i in.) 185
Rhizobium
— wpływ herbicydu na rozwój (WRÓBEL T.) 39
— wpływ żywienia związkami węgla (GOŁĘBIOWSKA J.) . . . 327
Rhizosfera
— wpływ siewu mieszanego na mikroflorę (BALICKA N.) . . . 58
Rośliny motylkowe
— cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych (KOBUS J.) 137
— przydatność różnych podłoży do produkcji szczepionek (GOŁĘBIOWSKA J., WRÓBEL T.) 313
— wpływ czynników na pigmentację brodawek (NOWOTNY - MIECZYŃSKA A.) 42
Streptococcus diacetilactis
— wytwarzanie acetoiny (SUPIŃSKA - JAKUBOWSKA J.) . . . 151
Selen
— wpływ na wzrost i przemianę węglowodanową u *E. coli* (OPIEŃSKA - BLAUTH J., IWANOWSKI H.) 273
Thiobacillus thioparus i Thiobacillus thiooxydans
— układ cytochromowy i hemoproteidy (SZCZEPKOWSKI T. W., SKARŻYŃSKI B.) 93
Węgiel brunatny
— wpływ na produkcję kwasu cytrynowego u *Aspergillus niger* (LITYŃSKI T. i in.) 291
Żyto, mikoryza (STRZEMSKA J.) 24

kiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nr rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podawać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18..) lub (Cienkowski, 18..). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora (-ów) — dwukropek — tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, rok, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma; w wypadku zaś cytowania książki: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora (-ów), tytuł książki, wydanie, miejsce i rok wydania, firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie cm, g — nie gr, 100° — a nie 100° C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżniać „%“ — g na 100 g roztworu, „% objętościowy“ — ml na 100 ml roztworu, „stężenie %“ — g na 100 ml roztworu.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może się zwrócić do redakcji przy składaniu maszynopisu.